

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LE TISSU NERVEUX EN CULTURE

par Georges BARSKI et Jacques MAURIN (*).

(*Institut Pasteur, Service des Virus, Dr P. LÉPINE.*)

Il est généralement établi que le fort pouvoir bactériostatique de la streptomycine s'associe à une toxicité relativement faible pour les tissus animaux.

Ainsi, en 1945, Heilman, étudiant l'action de différents lots de streptomycine sur le tissu splénique de lapins en culture, a constaté que pour entraver la migration des macrophages et la croissance des fibroblastes il faut dépasser la concentration de 1/2.000 et pour certains échantillons du produit sans doute moins purifiés, une concentration de 1/4.000.

L'action de la streptomycine sur les tissus en culture a également été étudiée par Bucher (1948). Cet auteur constate, après huit heures de culture en milieu plasmatique additionné de streptomycine, que cette substance provoque, à la concentration de 1/200 à 1/100, un ralentissement des mitoses et l'apparition de mitoses pathologiques. Des résultats analogues ont été obtenus par Keilova (1948).

Les progrès de la purification de la streptomycine pharmaceutique ont incontestablement diminué la fréquence et la gravité des accidents observés parfois au cours du traitement. Néanmoins, comme le soulignent Farrington, Hull-Smith, Bunn

(*) *Société Française de Microbiologie, séance du 3 février 1949.*

et McDermott (1947), étudiant un produit hautement purifié, certaines réactions anaphylactiques et certaines lésions nerveuses sont dues à la streptomycine elle-même et non pas à ses impuretés.

Les effets neurotoxiques de cet antibiotique, en particulier son action sur la VIII^e paire crânienne, et peut-être sur une région supérieure du système nerveux, sont confirmés par de très nombreux auteurs. Voir notamment Hinshaw et Feldman (1945), Chase (1947), McDermott et Muschenheim (1947), Molitor (1947), Brown et Hinshaw (1946), Scherer (1948), Fouquet (1948), Mollaret (1948). Il en résulte que la toxicité de la streptomycine bien que réduite semble être spécifique pour certaines régions du système nerveux.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'action directe de la streptomycine sur le tissu nerveux embryonnaire en culture.

Nous employons un système de culture sur un support artificiel, sans caillot plasmatique, système où le milieu liquide contenant le produit étudié baigne directement le tissu et diffuse facilement à l'intérieur des cellules. Ainsi nous créons des conditions qui se rapprochent de la réalité physiologique.

La fonction du tissu nerveux que nous observons en culture est la migration cellulaire, celle des neuroblastes et des cellules gliales. Une telle migration donne une idée assez précise de la vitalité du tissu cultivé. D'autre part l'aspect caractéristique des neuroblastes émigrés dans la périphérie de la culture permet de les différencier facilement des cellules gliales. La régularité de la migration cellulaire permet d'établir une statistique qui est à la base de nos évaluations.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

Le tissu qui nous sert comme test principal est celui de méencéphale d'embryon de poulet au treizième jour de l'incubation.

Le milieu liquide baignant le tissu en culture est composé d'un mélange de sérum de poule, d'extrait embryonnaire et de liquide de Tyrode. La technique de culture du tissu nerveux a été décrite dans ces *Annales* (Barski et Maurin, 1948).

Nous avons employé dans nos expériences, pour les comparer, deux échantillons de streptomycine du commerce : 1^o une streptomycine (chlorhydrate) Merck (1946), que nous nommons « Stm 46 », et 2^o une streptomycine (sel chloruré-calcique) Merck (1948), nommée « Stm 48 ».

La streptomycine est dissoute dans le liquide de Ringer et cette solution est ajoutée au milieu liquide de culture, à raison de 10 p. 100. Le pH du milieu est maintenu entre 7,2 et 7,4. Chaque flacon de streptomycine contenant 1 million d'unités, nous préparons nos solutions de façon à avoir dans le milieu des concen-

trations de 100, 1.000 et 10.000 unités par centimètre cube. Pour la « Stm 46 », la solution de 10.000 unités par centimètre cube correspond à une concentration de $1/65$; 1.000 unités par centimètre cube équivalent à une concentration de $1/650$, etc.

Pour la « Stm 48 » 10.000 unités par centimètre cube correspondent à une concentration de $1/74$, 1.000 unités à une concentration de $1/740$, etc.

Pour les fortes concentrations, le produit forme avec le milieu un trouble et, après une incubation de vingt-quatre heures à 37° C, un dépôt. Ce dépôt est plus important avec la « Stm 48 ». Mais le titrage du milieu après centrifugation (1) a démontré que le séjour à l'étuve pendant vingt-quatre heures n'entraîne, malgré la formation du précipité, aucune diminution notable du titre bactériostatique du milieu. D'ailleurs nous constatons également le maintien du titre bactériostatique dans le cas où le milieu reste dans les mêmes conditions en contact avec le tissu.

RÉSULTATS.

Nous rapportons ici les résultats de 138 cultures : 77 effectuées avec la streptomycine 1946 et 61 avec la streptomycine 1948 (témoins compris).

Nous comptons les cellules émigrées quarante-huit heures après la mise en culture.

Nous donnons en tableaux un aperçu de la migration cellulaire dans les quatre séries de cultures du tissu nerveux en milieu contenant la « Stm 46 » (tableau I) ou la « Stm 48 » (tableau II).

Dans chaque série, toutes les cultures sont effectuées avec le même cerveau, dans un milieu de même origine. L'activité migratrice des explants peut en effet varier dans certaines limites, d'un embryon à l'autre.

On voit que la migration des neuroblastes a lieu normalement, même en présence de 100 unités de streptomycine 46 par centimètre cube.

La concentration de 1.000 unités par centimètre cube exerce une action inhibitrice aussi bien sur la migration des neuroblastes que des cellules gliales.

La concentration de 10.000 unités par centimètre cube est franchement toxique.

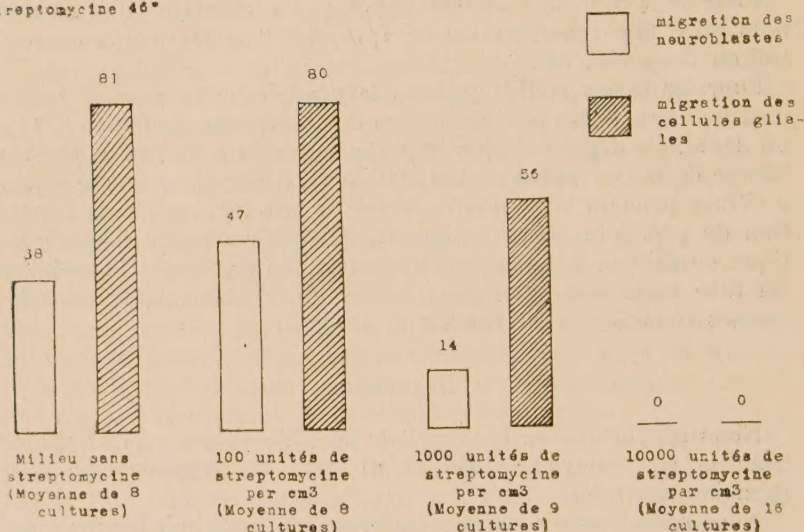
Comme on le voit, la migration dans les cultures témoins sans streptomycine dans les séries IV et V est très comparable à celle des séries I et II, ce qui nous donne une base de comparaison.

L'effet excitant sur la migration cellulaire de la « Stm 48 » se

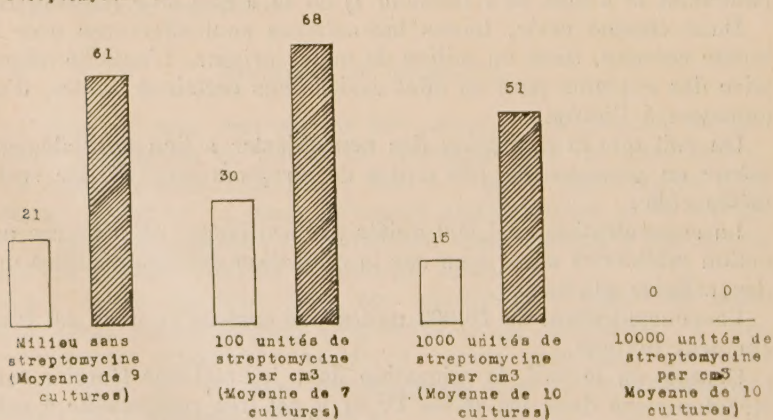
(1) Les titrages ont été effectués dans le service de chimie thérapeutique de l'Institut Pasteur grâce à l'amabilité de M^{me} Grumbach.

TABLEAU N°1

I^{re} SERIE
"Streptomycine 46"



II^{ème} SERIE
"Streptomycine 45"



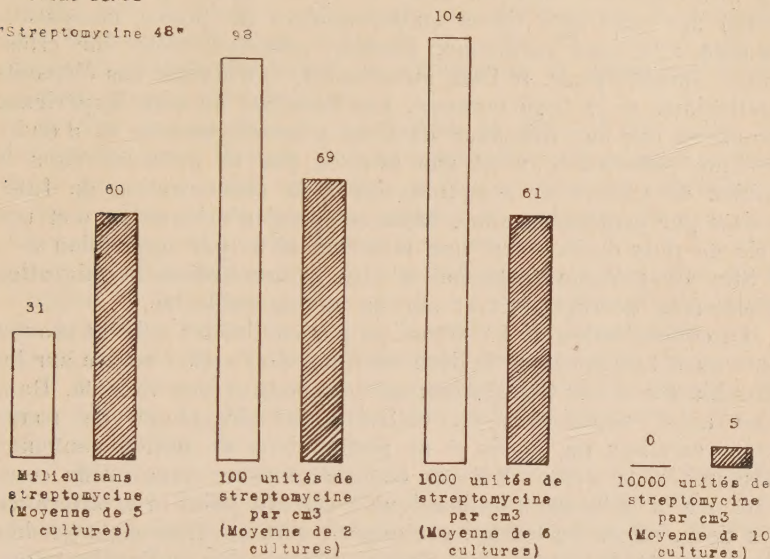
montre beaucoup plus fort que celui de la « Stm 46 » ; il s'exerce surtout sur les neuroblastes et se maintient aux concentrations plus élevées, de l'ordre de 1.000 unités par centimètre cube.

La concentration de 10.000 unités par centimètre cube est ici

TABIEAU N° 2

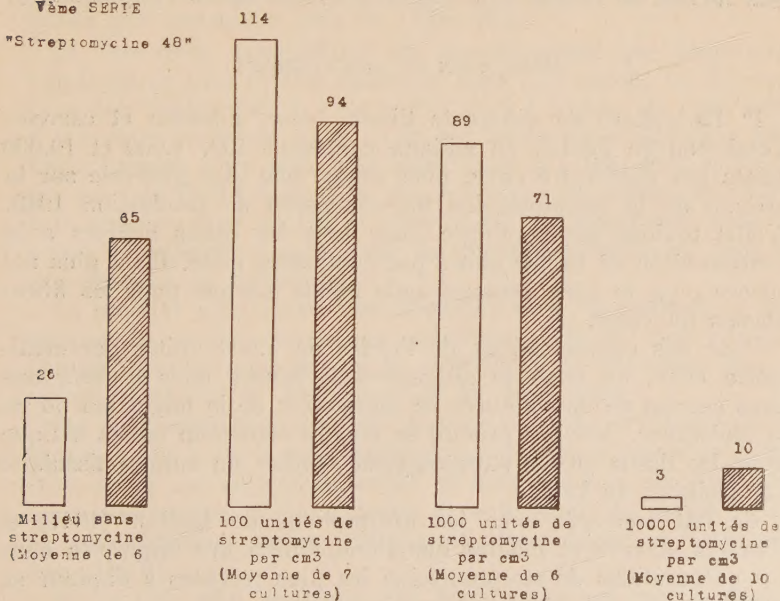
IVème SERIE

"Streptomycine 48"



Vème SERIE

"Streptomycine 48"



encore fortement toxique et les quelques cellules émigrées sont dégénérées.

Nous avons également recherché l'effet de trois concentrations de streptomycine 48 (100, 1.000 et 10.000 unités par centimètre cube) sur différents tissus embryonnaires de poulet comparativement : le tissu cardiaque, donnant essentiellement une croissance fibroblastique, le tissu pulmonaire, fournissant des éléments épithéliaux et le tissu nerveux. Les résultats de cette expérience montrent que la croissance de tissu mésenchymateux et d'endothélium pulmonaire n'est pas affectée par la présence dans le milieu de culture de streptomycine à la concentration de 1.000 unités par centimètre cube. Mais cet essai d'orientation met une fois de plus en évidence que la « Stm 48 » (par opposition à la « Stm 46 ») excite fortement à cette concentration la migration d'éléments névrogliques et surtout de neuroblastes.

La concentration de 10.000 unités par centimètre cube se montre fortement toxique pour le tissu nerveux. Son action nocive sur les fibroblastes et sur l'épithélium est beaucoup moins violente. Dans une autre expérience, en cultivant des fragments de cœurs embryonnaires de souris et de poulet dans un milieu contenant 100 unités de « Stm 48 » par centimètre cube, nous avons constaté que la présence d'antibiotique n'entrave point la prolifération du tissu, même en culture prolongée ; certains fragments gardent leur faculté de contraction vingt-six heures après l'explantation.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

1° La culture de différents tissus, cœur, poumon et cerveau d'embryon de poulet, en milieux contenant 100, 1.000 et 10.000 unités par centimètre cube, nous donne une idée générale sur la toxicité de la streptomycine du commerce de production 1948. L'effet toxique est manifeste pour tous les tissus cultivés à la concentration de 10.000 unités par centimètre cube. Il est plus net encore pour le tissu nerveux mais moins marqué pour les fibroblastes du cœur.

Pour des concentrations de l'ordre de 1.000 unités par centimètre cube, au bout de quarante-huit heures nous n'observons dans aucune de nos cultures de diminution de la migration ou de la croissance. Ainsi le produit se montre beaucoup moins toxique pour les tissus que la streptomycine étudiée en culture tissulaire par Heilman en 1945.

Ce fait concorde avec les affirmations de Molitor (1947) et d'autres auteurs et montre que l'élimination des impuretés dans les préparations de streptomycine les plus récentes a diminué sa toxicité.

2° L'observation du tissu nerveux embryonnaire en culture dans un milieu additionné de streptomycine nous permet de constater deux faits :

a) Ce tissu est plus sensible que les tissus mésenchymateux et épithéliaux à l'action de ce produit. La concentration de 10.000 unités par centimètre cube supprime entièrement la migration des neuroblastes ; dans le cas de la « Stm 48 » on ne voit que quelques fibres nerveuses en croissance et quelques cellules gliales émigrées dégénérées.

b) Aux concentrations plus faibles de 100 à 1.000 unités par centimètre cube, l'action de la streptomycine sur ce tissu se manifeste par une notable excitation de la migration des neuroblastes.

Le nombre de neuroblastes émigrés en présence de streptomycine par rapport à celui des cultures témoins est de 3 à 2 environ pour la « Stm 46 » et de 4 à 1 environ pour la « Stm 48 ». L'effet excitant de la streptomycine sur la migration des cellules gliales est beaucoup moins important ; il est à peine perceptible pour la streptomycine 46 et plus net pour la streptomycine 48.

3° Aux concentrations qui augmentent le taux de migration des neuroblastes, la dégénérescence des cellules émigrées n'est pas plus rapide que dans le témoin.

4° D'après nos observations la croissance des fibres nerveuses à partir du fragment explanté est beaucoup moins sensible à l'action de fortes concentrations de streptomycine que la migration cellulaire. Elle persiste même à la concentration de 10.000 unités par centimètre cube de « Stm 48 ».

5° Les deux échantillons de streptomycine que nous avons employés se sont révélés différents dans leur action. La différence peut être interprétée si l'on admet qu'à l'origine de cette action il y a deux principes actifs : l'un qui freine toute migration cellulaire, présent à un taux plus élevé dans la « Stm 46 » et l'autre, qui est très probablement la streptomycine elle-même, qui exerce à la concentration de 100 à 1.000 unités par centimètre cube une action spécifique excitante sur la migration cellulaire, celle des neuroblastes en particulier.

Le premier composant, plus abondant dans la « Stm 46 », masquerait en partie cette action spécifique. Elle se manifeste pleinement dans les cultures de la série IV et V effectuées dans un milieu contenant la streptomycine 48, plus pure.

On peut remarquer que les concentrations de streptomycine qui exercent une nette action excitante sur les neuroblastes en culture (100 unités par centimètre cube) ne sont pas loin des concentrations atteintes en clinique, sinon dans le sang, du moins dans le liquide céphalo-rachidien [Comparetti, Pasquinucci et Zoli (1948), Rist (1949)].

6° Le seul effet analogue que nous ayons pu relever dans la littérature est l'action de la streptomycine sur la mobilité des spermatozoïdes, décrite par Hennaux, Dimitropoulos et Cordiez (1947).

Ces auteurs ont notamment constaté que la streptomycine à la concentration de 3 mg. par centimètre cube (donc à peu près de 2.000 unités par centimètre cube) augmente la mobilité des spermatozoïdes.

L'effet excitant de cet antibiotique sur les neuroblastes ne serait donc pas rigoureusement spécifique. Il n'en reste pas moins vrai que la sensibilité du tissu nerveux embryonnaire vis-à-vis de ce produit dépasse de beaucoup celle des tissus mésenchymateux et épithélial.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARSKI (G.) et MAURIN (J.), ces *Annales*, 1948, **74**, 312.
- [2] BROWN (H. A.) et HINSHAW (H. C.), *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1946, **21**, 347.
- [3] BUCHER (O.), in FANCONI (G.) et LÖFFLER (W.), *Streptomycin und Tuberkulose*, Bâle, 1948.
- [4] CHASE (J. S.), *Am. Rev. Tuberc.*, 1947, **56**, 418.
- [5] COMPARETTI (A. M.), PASQUINUCCI (G.) et ZOLI (A.), *Riv. Clinica pediatr.*, 1948, **46**, Fasc. VIII.
- [6] FARRINGTON (R. F.), HULL-SMITH (H.), BUNN (P. A.) et McDERMOTT (W.), *J. Am. med. Assoc.*, 1947, **134**, 679.
- [7] FOUQUET, CAUSSÉ, GUILLON et BOUTIER, *Bull et Mém. Soc. Med. Hôp. Paris*, 1948, n° 25, 821.
- [8] HEILMAN (D. H.), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1945, **60**, 365.
- [9] HENNAUX (L.), DIMITROPOULOS (E.) et CORDIEZ (E.), *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 1272.
- [10] HINSHAW (H. C.) et FELDMANN (W. H.), *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1945, **20**, 313.
- [11] KEILOVA (H.), *Experientia*, 1948, **4**, 483.
- [12] McDERMOTT (W.) et MUSCHENHEIM (C.), *Am. Rev. Tuberc.*, 1947, **56**, 384.
- [13] MOLLARET (P.), *Presse Méd.*, 1948, n° 11, 124.
- [14] MOLITOR (H.), *Bull. N.-Y. Acad. Med.*, 1947, **23**, 196.
- [15] RIST (N.), Communication personnelle, 1949.

RECHERCHES SUR LA FORMATION D'ACÉTOÏNE, AUX DÉPENS DE L'ACIDE PYRUVIQUE ET L'ÉTHANAL, PAR *BACILLUS SUBTILIS*

par M. LEMOIGNE, M. HOOREMAN et M^{me} M. CROSON (*).

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

Introduction.

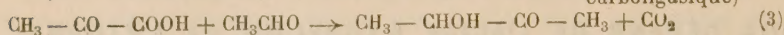
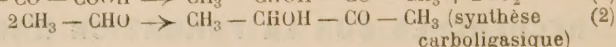
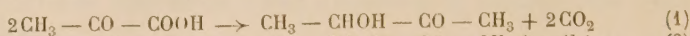
Le mécanisme de la formation d'acétoïne par les organismes a fait l'objet de travaux nombreux et partiellement contradictoires. D'après Neuberg, cette formation se ferait, dans le cas de la levure, par condensation de deux molécules d'éthanal sous l'influence d'un enzyme spécial : la carboligase. L'existence de cet enzyme a été confirmée par Tomiyasu et par d'autres auteurs, mais a été également contestée, notamment par Dirscherl. L'une des deux molécules d'éthanal, nécessitée par la réaction précédente, semble devoir, au moins dans certains cas, provenir de la décarboxylation de l'acide pyruvique. Nous renvoyons à un exposé général relatif à cette question [4].

Aux travaux signalés dans cet exposé, il convient d'ajouter ceux de Johnson et coll. [2], qui ont mis en évidence une transformation partielle de l'acide pyruvique en acétoïne par *Clostridium acetobutylicum*; de Tankö et coll. [3], qui ont étudié l'activité optique de l'acétoïne formée aux dépens de l'acide pyruvique par certains tissus animaux; de Stahly et Werkmann [4], qui, par addition d'éthanal à des cultures d'*Aerobacillus polymyxa*, ont obtenu un accroissement de la formation d'acétoïne et de butanediol; de Silverman et Werkman [5], qui ont montré que des extraits enzymatiques provenant d'un microbe, *Aerobacter aerogenes*, étaient capables de transformer l'acide pyruvique en acétoïne; de Green et coll. [6] enfin, qui, avec des extraits enzymatiques obtenus à partir de tissus animaux variés, ont observé une transformation en acétoïne de l'acide pyruvique et l'éthanal, ajoutés séparément ou simultanément au milieu.

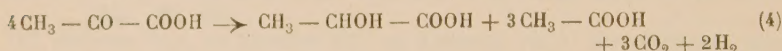
Suivant les organismes, l'acétoïne aurait donc pour précurseurs.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 février 1949.

soit l'acide pyruvique, soit l'éthanal, soit ces deux composés simultanément, conformément aux réactions globales :



Toutefois, dans le cas de *Aeromonas hydrophila*, microbe fournissant aux dépens des glucides d'importantes quantités d'acétoïne et de butanediol, le métabolisme de l'acide pyruvique conduit principalement à $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{COOH}$, $\text{CH}_3 - \text{COOH}$, CO_2 et H_2 , et à de faibles quantités seulement d'acétoïne et de butanediol [7] ; la réaction essentielle ne serait plus ni 1 ni 3, mais 4 :



De même *B. subtilis*, microbe produisant également d'importantes quantités d'acétoïne aux dépens des glucides, n'effectuerait aucune des réactions 1, 2 ou 3, d'après les résultats obtenus par Lafon [8] ; cependant, dans des cultures de *B. subtilis* sur acide pyruvique, Barrit observe une formation d'acétoïne, mais, recherchant ce composé par une méthode qualitative, il ne donne aucun résultat chiffré [9]. Aussi avons-nous abordé l'étude de la question afin de déterminer exactement quelle était, parmi les quatre réactions précédentes, celles que *B. subtilis* pouvait effectuer.

Techniques expérimentales.

Nous avons employé un *Bacillus subtilis* aérobie strict : la souche B S 2 G 1-2 du Service des Fermentations de l'Institut Pasteur.

Ce microbe est cultivé à 31°, en boîtes de Roux de 1 litre, contenant 100 cm³ d'un milieu ayant la composition suivante :

Peptone bactériologique Vaillant	7,5 g.
PO ₄ (NH ₄) ₂ H	7,5 g.
PO ₄ KH ₂	4 g.
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,2 g.
SO ₄ Mn, 4H ₂ O	0,03 g.
SO ₄ Fe, 7H ₂ O	0,03 g.
Saccharose	30 g.
Eau de source	Q. S. 1.000 cm ³

La culture est faite pendant un temps donné pour chaque essai ; on sépare ensuite le milieu par centrifugation, on met en suspension le culot bactérien dans de l'eau bidistillée, contenant ou non ClK ou ClNa et on centrifuge à nouveau. On répète ce lavage un nombre variable de fois suivant les essais. Finalement on met à nouveau en suspension dans l'eau bidistillée, on homo-

génése par agitation avec des billes de verre et passage à travers une gaze. On détermine l'extrait sec de cette émulsion bactérienne en évaporant au bain-marie et en desséchant à 100-110°.

On dilue cette émulsion dans une solution de phosphate M/5, éventuellement additionnée de carbonate de sodium ; on ajoute des quantités données de pyruvate et d'éthanal, en solution M/25 ou M/12,5. On porte à 31° pendant deux heures trente à trois heures. On dose le butanediol et l'acétoïne au départ et à la fin de l'expérience, à l'aide des microméthodes établies par l'un de nous [10].

Action de *B. subtilis* sur l'acide pyruvique.

TRANSFORMATION DE L'ACIDE PYRUVIQUE EN GAZ CARBONIQUE, ACÉTOÏNE ET BUTANEDIOL.

Nous décrivons d'abord une expérience faite suivant la technique de Warburg (expérience n° 52).

Les bactéries proviennent d'une culture de deux jours ; elles ne sont pas lavées, mais simplement séparées par centrifugation du milieu de culture et mises en émulsion dans l'eau bidistillée ; le poids sec des corps bactériens dans 1 cm³ d'émulsion est de 30,5 mg.

Dans chaque fiole Warburg, on place 1 cm³ de cette émulsion, 1 cm³ de phosphate de potassium M/5 à pH 7,3, et 1 cm³ de pyruvate de sodium M/12,5 — pouvant par conséquent, d'après l'équation 1, donner au maximum 3.360 µg. d'acétoïne, — ou 1 cm³ d'eau dans l'essai-témoin. Certaines fioles sont remplies d'air et contiennent de la potasse dans leur cellule centrale ; les autres sont remplies d'un mélange gazeux à 90 p. 100 d'azote et 10 p. 100 de CO₂. L'incubation a lieu à 32° pendant deux heures trente.

Les essais faits en aérobiose montrent que la consommation d'oxygène demeure sensiblement la même en l'absence ou en présence de pyruvate (fig. 1) ; ceux faits en anaérobiose, que la souche de *B. subtilis* utilisée décarboxyle énergiquement l'acide pyruvique (fig. 2).

En outre, les dosages d'acétoïne et de butanediol contenus dans les fioles de Warburg permettent de suivre avec plus de précision le phénomène. Le tableau I résume nos résultats.

En aérobiose, dans l'essai-témoin sans pyruvate, on observe une diminution de la somme acétoïne + butanediol ; ces composés, qui proviennent ici du milieu ayant servi à l'obtention des bactéries, existent en effet dans les émulsions bactériennes utilisées. à des doses plus ou moins faibles suivant le nombre des lavages. Et on peut admettre que la disparition de ces composés, observée dans l'essai-témoin, a lieu également dans l'essai fait avec pyruvate, puisque la consommation d'oxygène est du même ordre

dans les deux cas (fig. 1). Pour avoir la valeur de la somme acétoïne + butanediol formée aux dépens du pyruvate, il faut donc déduire de sa valeur en fin d'expérience, non pas sa

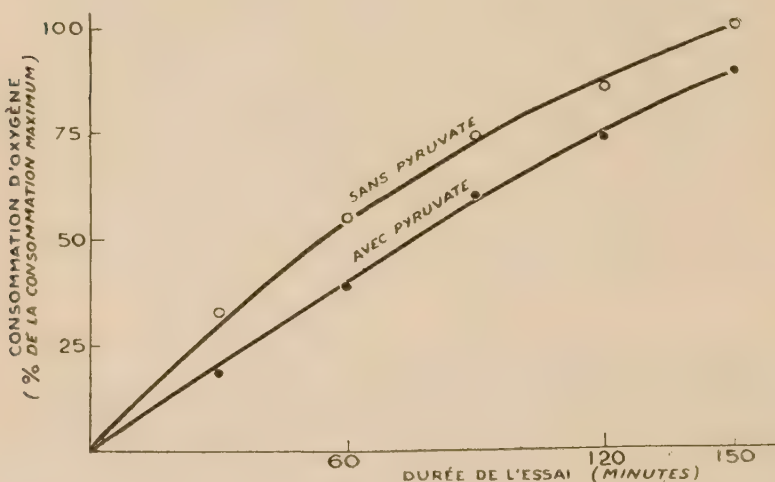


FIG. 1

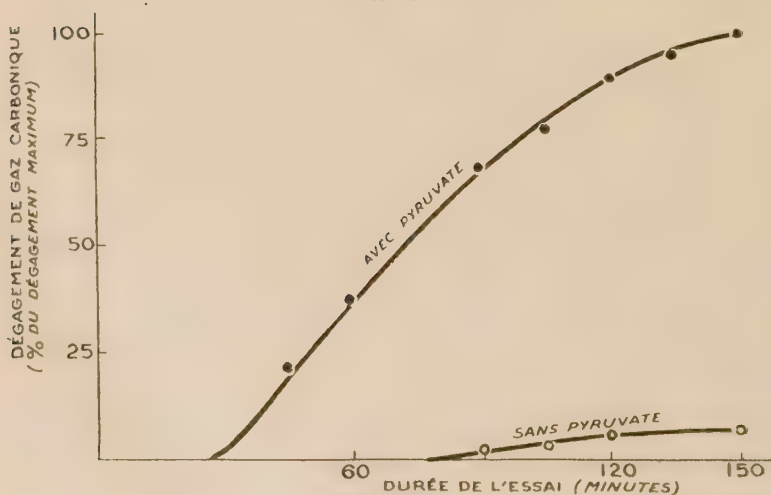


FIG. 2.

valeur en début d'expérience, mais sa valeur en fin d'expérience dans l'essai-témoin : $2,134 - 168 = 1.966 \mu\text{g}$.

De même, en anaérobiose, la somme acétoïne + butanediol formés aux dépens de l'acide pyruvique est de $2.630 - 539 = 2.091 \mu\text{g}$. Ici d'ailleurs, il n'y a plus, comme précédemment,

TABLEAU I. — **Formation d'acétoïne (AC.) et de butanediol (BD.) aux dépens de l'acide pyruvique (expérience n° 52).**

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	AC. ET BD. contenus dans une fiole de Warburg en $\mu\text{g.}$			SOMME AC. + BD. formés aux dépens de l'acide pyruvique en $\mu\text{g.}$
	AC.	BD.	AC. + BD.	
Au début.	112	380	492	
Après 2 h. 30 à 32° dans l'air :				
Sans pyruvate	168	0	168	
Avec pyruvate	1.800	334	2.134	1.966
Après 2 h. 30 à 32° dans $\text{N}_2 + \text{CO}_2$:				
Sans pyruvate	298	241	539	
Avec pyruvate	1.610	1.020	2.630	2.091

diminution de cette somme dans l'essai-témoin, mais au contraire augmentation, si faible toutefois qu'on peut l'attribuer aux erreurs d'expérience. En outre, on observe une formation de butanediol relativement importante.

A ce sujet, nous devons préciser que c'est seulement avec des bactéries insuffisamment lavées que du butanediol est formé aux dépens de l'acide pyruvique, déjà en aérobiose, et *a fortiori* en anaérobiose. Au contraire, avec des bactéries abondamment lavées, le butanediol n'apparaît pas, même en anaérobiose. Or, une indication sur l'efficacité du lavage est donnée par la valeur de la somme acétoïne + butanediol au début de l'expérience : lorsque cette somme est nulle, ou bien faible, on peut estimer que le lavage a été complet; et dans ce cas le butanediol ne se forme pas. Ceci est illustré par le tableau II qui donne, en $\mu\text{g.}$, les quantités

TABLEAU II. — **Non-formation de butanediol (BD.) avec des bactéries lavées, dans des conditions où l'acétoïne (AC.) se forme aux dépens de l'acide pyruvique.**

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	ESSAI N° 65		ESSAI N° 67		ES-AI N° 74	
	AC.	BD.	AC.	BD.	AC.	BD.
Au début	70	0	0	0	0	0
Après 2 h. 30 à 31° dans $\text{N}_2 + \text{CO}_2$:						
Sans pyruvate.	90	10	0	0	0	0
Avec pyruvate.	1.260	0	1.146	0	1.750	0

d'acétoïne et de butanediol en début d'expérience et après deux heures trente à 31°. pour des essais faits en anaérobiose avec 1-cm³ de pyruvate M/25.

Dans l'action de *B. subtilis* sur l'acide pyruvique — et par extension sur le glucose, probablement — c'est donc bien l'acétoïne qui se forme avant le butanediol. Celui-ci ne peut provenir que d'une réduction ultérieure de l'acétoïne, par des donateurs d'hydrogène existant dans le milieu réactionnel, apportés dans le cas présent par l'émulsion bactérienne insuffisamment lavée.

INFLUENCE DU NOMBRE DES LAVAGES ET DE L'ÂGE DE LA CULTURE.

Pour que les résultats soient comparables entre eux, nous les avons exprimés en µg. d'acétoïne formée par milligramme de corps bactériens (poids sec), tableau III.

TABLEAU III. — Influence du nombre des lavages et de l'âge de la culture ayant fourni les bactéries.

ÂGE DE LA CULTURE (jours)	BACTÉRIES LAVÉES 3 fois A.C. formée µg. p. ur 1 mg. de corps bactériens	BACTÉRIES LAVÉES 9 fois A.C. formée µg. pour 1 mg. de corps bactériens
1.	130	157
3.	43	56
6.	36	57

On voit que des lavages, même répétés, n'éliminent apparemment pas le système formateur d'acétoïne. Par contre, l'âge de la culture a une influence très marquée : des bactéries provenant d'une culture de un (ou deux jours) sont beaucoup plus actives que celles qui proviennent d'une culture de trois jours.

INFLUENCE DU pH.

Nos résultats, présentés par le tableau IV, ont été obtenus avec des bactéries provenant d'une culture d'un jour, lavées trois fois, et mises en suspension dans des solutions de phosphate M/5 additionnées de carbonate de sodium en quantités telles que le pH initial du milieu réactionnel soit compris entre 7,6 et 10. L'incubation a lieu pendant deux heures trente à 31°.

Nous indiquons la somme acétoïne + butanediol formés aux dépens de l'acide pyruvique, exprimée ici encore en µg. par milligramme de corps bactériens. En donnant la somme acétoïne

+ butanediol, au lieu de l'acétoïne seulement, nous tenons compte d'une transformation éventuelle de l'acétoïne en butanediol, dont il a été question ci-devant.

TABLEAU IV. — Influence du pH initial.

pH INITIAL	7,6	8,45	9,2	10
AC. + BD. (µg. par milligramme de corps bactériens)	121	134	105	118

On voit que l'activité des préparations n'a aucune tendance à diminuer en milieu faiblement alcalin : l'optimum d'activité semble avoir lieu pour un pH initial de 8,5.

RENDEMENT EN ACÉTOÏNE.

Dans le tableau V, nous donnons, pour différents essais, les quantités d'acide pyruvique ajoutées, en µg. par milligramme, de corps bactériens, et la somme acétoïne + butanediol formés, en µg. par milligramme de corps bactériens, en p. 100 de la quantité d'acide pyruvique ajoutée, et en p. 100 de la valeur théorique maximum de cette somme, calculée d'après l'équation I.

TABLEAU V. — Rendement en acétoïne.

NUMÉRO de l'essai	TEMPS d'incubation (heures)	ACIDE pyruvique ajouté (µg par milligramme de corps bactériens)	AC. + BD. FORMÉS		
			µg. par milligramme de corps bactériens	Pourcentage de l'acide pyruvique ajouté	Pourcentage du maximum théorique
110.		127	45	35	70
39.	2,40	142	62	44	88
65.	2,15	220	72	33	66
67.	2,15	352	115	32,5	65
69.	2,15	260	58	22	44
75.	2,30	260	130	49,5	99
	2,30	370	157	47	94
77.	2,30	541	57	16	32

Le tableau V montre que, en moins de trois heures, on obtient des rendements élevés en acétoïne, qui dépassent en général 60 p. 100 et atteignent parfois 94-99 p. 100 du rendement maximum théorique. Dans l'essai 77 où le rendement est faible, la quantité d'acide pyruvique était spécialement élevée, et les bactéries provenaient d'une culture de six jours.

POUVOIR ROTATOIRE DE L'ACÉTOÏNE FORMÉE.

Afin de rechercher si l'acétoïne formée était optiquement active, nous en avons préparé des quantités relativement importantes.

Nous mettons en émulsion dans du phosphate de potassium M/5 à pH 7,3, des bactéries lavées quatre fois, provenant d'une culture âgée d'un jour. Dans une fiole de Fourneau, nous plaçons 250 cm³ de cette émulsion contenant par centimètre cube 21,3 mg. de corps bactériens, et 50 cm³ de solution contenant 12,5 g. de pyruvate de sodium. L'incubation a lieu à 31°.

Un dégagement gazeux très net ne tarde pas à se manifester. Des prélèvements faits au bout de trente minutes, deux heures, deux heures trente, montrent que la fiole contient alors respectivement 0,67, 3,24, 3,93 g. d'acétoïne. Dans un essai-témoin sans pyruvate, la teneur en acétoïne est constamment nulle. Par distillation sous pression ordinaire, nous obtenons une solution d'acétoïne dans laquelle ce composé a pour pouvoir rotatoire spécifique $(\alpha)_D^{15}$ ($c = 1,63$ p. 100 dans l'eau) = $-18,4$. Une racémisation partielle de l'acétoïne ayant généralement lieu sous l'effet du chauffage, ce pouvoir rotatoire est certainement inférieur à celui de l'acétoïne fraîchement formée ; de toute façon, nous pouvons dire que l'acide pyruvique est transformé en acétoïne lévogyre.

CONCLUSIONS.

La souche de *B. subtilis* utilisée décarboxyle rapidement l'acide pyruvique en donnant de l'acétoïne avec un rendement très bon. Par l'action de donateurs d'hydrogène existant éventuellement dans l'émulsion bactérienne, l'acétoïne est partiellement transformée en butanediol. Le système formateur d'acétoïne est fixé très solidement sur les bactéries : plusieurs lavages à l'eau bidistillée, à la température du laboratoire, ne l'éliminent pas. Il est spécialement abondant dans les bactéries provenant d'une culture jeune, son optimum d'activité paraît se situer aux environs de pH 8,5. L'acétoïne formée est lévogyre.

Action de *B. subtilis* sur l'éthanal.

Nous avons fait plusieurs essais, dans les mêmes conditions générales que précédemment, mais en remplaçant l'acide pyruvique par l'éthanal.

Sur 10 essais, 7 conduisent à une formation nulle d'acétoïne et 3 à une formation faible. Dans le tableau VI, nous consignons ces derniers essais, et, à titre d'exemple, 3 des 7 essais précédents. A plusieurs reprises, nous avons vérifié, comme nous l'indiquons

dans le tableau VI, que les émulsions bactériennes qui paraissent sans action sur l'éthanal transforment cependant l'acide pyruvique en acétoïne. Dans tous les essais mentionnés, l'incubation a eu lieu en anaérobiose, à 31° pendant trois heures.

TABLEAU VI. — Action comparée de *B. subtilis* sur l'acide pyruvique et sur l'éthanal.

NUMÉRO de l'essai	ÉTHANAL ajouté (μ g. par milligramme de corps bactériens)	ACIDE pyruvique ajouté (μ g. par milligramme de corps bactériens)	AC. ET BD. FORMÉS		
			μ g. par milligramme de corps bactériens	Pourcentage du maximum théorique	
				aux dépens de l'éthanal	aux dépens de l'acide pyruvique
78.	187	0	0	0	
	0	374	127		67,8
	0	374	118		62
80.	154	0	0	0	
	0	122	41		67,2
110.	63,4	0	0	0	
	0	127	44,6		70
43.	587		50	8,5	
94.	90		4,2	4,6	
94 bis. . .	90		3,1	3,4	

On voit que la formation d'acétoïne aux dépens de l'éthanal est ou bien nulle, ou bien incomparablement plus faible qu'aux dépens de l'acide pyruvique. Et même, dans ces derniers cas, on peut se demander si les petites quantités d'acétoïne formées proviennent réellement de l'éthanal, ou au contraire de quelque substance glucidique subsistant dans les corps bactériens.

En conclusion, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une formation indubitable de l'acétoïne aux dépens de l'éthanal.

Action de *B. subtilis* sur le mélange acide pyruvique + éthanal.

Enfin nous avons fait agir les émulsions bactériennes sur des solutions contenant à la fois pyruvate et éthanal, et nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus en l'absence d'éthanal. Comme précédemment, l'incubation a lieu à 31° pendant trois heures. Le tableau VII résume nos résultats.

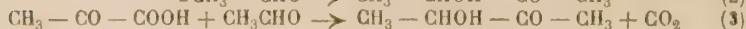
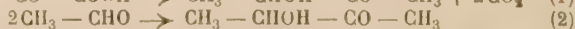
TABLEAU VII. — Action comparée de *B. subtilis* sur l'acide pyruvique et sur le mélange acide pyruvique + éthanal.

NUMÉRO de l'essai	ÉTHANAL ajouté (µg. par milligramme de corps bactériens)	ACIDE pyruvique ajouté (µg. par milligramme de corps bactériens)	AC. + BD. FORMÉS		DIFFÉRENCE
			µg par milligramme de corps bactériens	Pourcentage du maximum théorique par rapport au pyruvate seul	
78	0	374	127	67,8	+ 2,2
	187	374	131	70	
80	0	422	40,7	66,7	+ 0,5
	154	422	41	67,2	
92	0	430	33	51	+ 7
	65	430	37,8	58	
110	0	427	55,3	70,2	- 2,6
	63	427	43	67,6	

On voit que l'augmentation de la formation d'acétoïne en présence d'éthanal n'est pas significative ; d'ailleurs, dans un essai, il n'y a pas eu augmentation, mais diminution. Il semble que *B. subtilis* soit incapable de transformer l'éthanal en acétoïne, même en présence d'acide pyruvique.

Discussion.

Les plus courantes des réactions biologiques globales donnant naissance à l'acétoïne sont :



Contrairement aux conclusions de Lafon [8], le système formateur d'acétoïne existant chez *B. subtilis*, s'il n'effectue pas les réactions 2 et 3, effectue parfaitement la réaction 1. Effectuant la réaction 1 et non les réactions 2 et 3, ce système se rapproche de celui qu'on trouve chez *Aerobacter aerogenes* [5], mais s'en éloigne par son aptitude à fonctionner en milieu légèrement alcalin. Effectuant la réaction 1 et fonctionnant en milieu légèrement alcalin, il se rapproche du système qu'on trouve chez les organismes supérieurs [6], mais s'en éloigne par inaptitude apparente à effectuer les réactions 2 et 3.

On peut donc affirmer — si l'on réserve le cas de *Aeromonas hydrophila* (Cf. Introduction) — que les systèmes formateurs

d'acétoïne trouvés chez différents organismes présentent entre eux des ressemblances marquées bien qu'ils ne soient pas absolument identiques. Les résultats de Green et coll. [6] suggèrent d'ailleurs que ces systèmes ont le même coferment, qui ne serait autre que la cocarboxylase, mais diffèrent les uns des autres par leur apoferment. Nous nous proposons de vérifier ultérieurement la validité de cette hypothèse dans le cas particulier de *B. subtilis*.

Résumé.

1° La souche de *B. subtilis* utilisée décarboxyle rapidement l'acide pyruvique en donnant de l'acétoïne avec un rendement élevé. Par action de donateurs d'hydrogène existant éventuellement dans l'émulsion bactérienne, l'acétoïne se transforme partiellement en butanediol.

2° Le système formateur d'acétoïne aux dépens de l'acide pyruvique est fixé très solidement sur les bactéries : plusieurs lavages à l'eau bidistillée, à la température du laboratoire, ne l'éliminent pas ; il est spécialement abondant dans les bactéries provenant d'une culture jeune ; son optimum d'activité paraît se situer aux environs de pH 8,5. L'acétoïne formée est lévogyre.

3° Dans nos conditions expérimentales, la souche utilisée est incapable de provoquer une formation d'acétoïne par condensation de l'éthanal sur lui-même ou sur l'acide pyruvique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FRANKE (W.), dans Nord-Weidenhagen, *Handbuch der Enzymologie*, Leipzig, 1940, 2, 779.
- [2] JOHNSON (M. J.), PETERSON (W. H.) et FRED (E. B.). *J. biol. Chem.*, 1933, 101, 145.
- [3] TANKO (B.), MUNK (L.) et ABONYI (I.). *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1940, 264, 91.
- [4] STAHLY (G. L.) et WERKMAN (C. H.). *Biochem. J.*, 1942, 36, 575.
- [5] SILVERMAN (M.) et WERKMAN (C. H.). *J. biol. Chem.*, 1941, 138, 35.
- [6] GREEN (D. E.), WESTERFELD (W. N.), VENNESLAND (B.) et KNOX (W. E.). *J. biol. Chem.*, 1942, 145, 69.
- [7] STANIER (R. Y.) et ADAMS (G. A.). *Biochem. J.*, 1944, 38, 168.
- [8] LAFON (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, 14, 263.
- [9] BARRIT (M. M.). *J. Path. Bact.*, 1937, 44, 679.
- [10] HOOREMAN (M.). *Thèse Doctorat*, Paris, 1948.

LÉSIONS ET RÉACTIONS DU TISSU LYMPHOÏDE

III. — TROUBLES CIRCULATOIRES ET LÉSIONS LYMPHOCYTAIRES

par ALBERT DELAUNAY, JACQUELINE LEBRUN, MARCELLE DELAUNAY
et ELIE FOUCQUIER (*).

I

I. — Des lésions cellulaires et des réactions conjonctives importantes apparaissent régulièrement dans le tissu lymphoïde des animaux traités par une endotoxine bactérienne (1). Les lésions lymphocytaires observées en ce cas ont peut-être pour facteurs des hormones, et en particulier les hormones cortico- et médullo-surrénales (2), mais celles-ci n'ayant aucun pouvoir lymphotoxique direct, un mécanisme plus complexe intervient certainement. Nous avons songé à mettre en cause des *troubles de l'hydraulique circulatoire*.

II. — Que des troubles de l'hydraulique circulatoire, en modifiant la nature des échanges qui se font normalement entre le sang et les tissus, puissent entraîner la dégénérescence et même la mort des cellules, l'existence de ce fait se trouve déjà démontrée par d'innombrables preuves. Il survient notamment lorsque les tissus ne reçoivent plus une quantité de sang suffisante (*anémie locale*), autrement dit lorsqu'ils entrent en état d'ischémie. Quelle que soit la cause de cette *ischémie* : obstruction vasculaire par thrombose, embolie ou compression externe, ou encore troubles vaso-moteurs importants, on observe constamment dans le territoire intéressé une nécrose des cellules et de la trame conjonctive (*infarctus* rouge ou blanc, *infarctissement* hémorragique). Comme le montrent chaque jour les observations cliniques, tous les organes (poumons, cœur, reins, rate, etc.) peuvent être spontanément le siège d'infarctus. On parvient aussi à reproduire ces derniers expérimentalement. A cet égard, l'*infarctus pulmonaire* a d'abord été le mieux étudié. Au cours de ces dernières années, l'*infarctus du myocarde* a surtout retenu l'atten-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 janvier 1949.

(1) Ces Annales, 1949, 76, 87.

(2) Ces Annales, 1949, 76, 203.

lion (3). Quant aux *lésions du tissu lymphoïde* consécutives à des troubles circulatoires, elles ont fait également l'objet de quelques recherches, spécialement par P. Gauthier-Villars et P. Aboulker.

L'importance toute particulière de ces lésions, chez les sujets intoxiqués par une endotoxine, nous a incités à reprendre l'examen de cette question. En ce domaine, nous avons fait deux séries d'expériences : d'une part, nous avons essayé de préciser le mieux possible la nature des désordres histologiques qui prennent place dans des ganglions ischémiés ; d'autre part, nous avons observé méthodiquement l'évolution de la dégénérescence cellulaire sur des lymphocytes isolés, introduits dans un tissu anémique. Nous les rapporterons ici succinctement.

1° Nous avons recherché, chez des cobayes en bon état et anesthésiés par l'éther, les ganglions du cou (on trouve ceux-ci assez facilement le long des deux gouttières carotidiennes), puis nous avons appliqué, sur le pédicule vasculaire se rendant à l'un d'eux, une ligature plus ou moins serrée (4). Nous déterminions ainsi, dans le ganglion correspondant, un état d'ischémie totale ou partielle (ischémie partielle lorsque la ligature était assez lâche ou lorsqu'une circulation collatérale se développait ultérieurement). L'opération une fois faite, aseptiquement cela va sans dire, le ganglion était remis en place, la peau sus-jacente recousue, et les cobayes placés en observation.

Au bout de laps de temps variables (trois, six, neuf, treize, dix-sept, vingt et trente et un jours), nous avons sacrifié les animaux et prélevé les ganglions opérés. Les pièces examinées de façon précoce étaient en général hypertrophiées ; sur coupes du tissu, nous avons remarqué d'importantes lésions œdémateuses, des capillaires gorgés de sang, des nappes hémorragiques, une infiltration souvent intense de polynucléaires. Les lymphocytes et les cellules réticulées se trouvaient dispersés dans l'œdème et un grand nombre de cellules avaient un noyau pyknotique. Lors des prélèvements tardifs, les ganglions étaient normaux ou diminués de volume. Sur coupes, nous avons observé toute une gamme de réactions cellulaires, allant d'une prolifération à peine marquée des éléments réticulés à une nécrose quasi totale du tissu. Dans ce dernier cas, presque tous les lymphocytes avaient disparu et l'organe se trouvait réduit à un petit nodule fibreux.

Sans doute il est rare que, chez les animaux traités par une endotoxine, les lésions ganglionnaires atteignent ce degré d'intensité. Toutefois, essentiellement, elles sont de même nature.

(3) Consulter sur ce sujet : H. KAUFMANN, *Sur certains cas d'infarctus du myocarde sans oblitération des artères coronaires. L'apoplexie myocardique*. Thèse médecine, Paris, 1941.

(4) C. R. Acad. Sci., 1948, **226**, 1110.

Ainsi, le problème de leur origine vasculaire se trouve déjà nettement posé.

2° Dans la seconde série d'expériences, notre façon d'opérer a été toute différente (5). Après avoir coupé finement dans du sérum homologue des ganglions cervicaux prélevés chez un cobaye, nous avons filtré sur gaze cette préparation pour obtenir une suspension cellulaire homogène. Ensuite, nous avons injecté celle-ci, sous le volume de 0,5 cm³, dans la peau de cobayes neufs. Enfin, après des intervalles de temps variables (de dix minutes à vingt-quatre heures) nous avons pratiqué une biopsie du tissu traité. L'examen des coupes a permis de faire les constatations suivantes. Tout d'abord, on ne voit dans le tissu conjonctif sous-épidermique que les lymphocytes qui ont été introduits artificiellement à cet endroit. Un peu plus tard (une heure après l'injection) survient une diapédèse de polynucléaires dont l'importance augmente progressivement pour devenir considérable au bout de vingt-quatre heures. Les *lymphocytes* disparaissent peu à peu au milieu des cellules venues du sang, mais aussi longtemps qu'on peut les retrouver (une quinzaine d'heures) on remarque qu'ils *conservent leur structure normale*.

Ces premiers résultats étant acquis, nous avons injecté dans la peau de nouveaux cobayes des suspensions lymphocytaires préparées comme les précédentes mais, cette fois, en mélange avec une dose d'adrénaline suffisante (c'est-à-dire 50 µg) pour perturber nettement la circulation locale (6). Dans ces conditions, comme le montrent les études histologiques, la diapédèse des polynucléaires fait totalement défaut mais les *lymphocytes* ne demeurent pas longtemps intacts. Au bout de quelques heures, ils *montrent des signes évidents de dégénérescence* ; le noyau, en particulier, se fragmente en boules de chromatine irrégulières (pycnose). Finalement, et c'est là le fait qui nous paraît capital, on observe sur les coupes des lésions lymphocytaires *absolument comparables* à celles que l'on voit dans les ganglions, le thymus ou la rate d'animaux qui ont reçu, par voie intrapéritonéale, une injection d'adrénaline ou d'endotoxine typhique.

On sait que l'adrénaline est incapable de détruire par action directe les lymphocytes (2). La dégénérescence rapide des cellules, observée dans notre seconde série d'expériences, ne peut donc résulter que de perturbations vasculaires. Mais de telles lésions, avons-nous dit, ressemblent à celles que l'on trouve dans le tissu lymphoïde des animaux traités par une endotoxine. Dès lors, il devient indispensable de rechercher jusqu'à quel point ces dernières sont aussi sous la dépendance de troubles circulatoires.

(5) *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 139.

(6) *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 314.

III. — *Des troubles circulatoires existent-ils chez les sujets intoxiqués par une endotoxine ?* Nous avons déjà répondu à cette question dans un Mémoire précédent (7). Ces troubles existent et ils sont importants. A mesure que l'intoxication progresse, le rythme cardiaque s'accélère et on note de profondes modifications de l'onde cardiovectographique (8). La tension artérielle, mesurée à la carotide, après s'être longtemps maintenue à des chiffres normaux, finalement s'effondre (9). Les artéριοles cutanées ou splanchniques (mésentère) ne tardent pas à être le siège de vagues de constriction intense. La perméabilité des capillaires cutanés diminue, cependant qu'augmente la résistance des mêmes vaisseaux. Corrélativement, on observe une inhibition généralisée de la diapédèse leucocytaire ; c'est même dans ce cas que le phénomène est le plus saisissant. Ajoutons encore à cette liste, car ces symptômes traduisent eux aussi des perturbations du système sanguin, la leucopénie et l'hémoconcentration...

Les troubles circulatoires sont donc nombreux au cours de l'intoxication typhique expérimentale. Faut-il les mettre en cause à l'origine des lésions diverses, et tout particulièrement lymphocytaires, qui se produisent dans la règle chez les animaux traités ? Peut-on admettre au moins qu'ils jouent un rôle essentiel, dans leur déterminisme ? Sincèrement, nous le croyons. Il existe, en effet, *sur le plan histologique*, trop de points de ressemblance, trop d'analogies entre les lésions typhiques et celles qui surviennent dans un tissu imparfaitement irrigué (4). En tout cas, on observe de l'œdème et de la congestion, des hémorragies et, dans les formes les plus graves, une nécrose tissulaire étendue. En tout cas, la dégénérescence lymphocytaire offre le même aspect (5).

D'ailleurs, nous ne sommes pas les premiers à invoquer un mécanisme de cet ordre. En fait, la même opinion a déjà été soutenue, tant en France qu'à l'étranger.

Parmi les *travaux français*, nous nous bornerons à rappeler ceux de J. Reilly (10), de P. Gastinel (11), de R. Laplane (12) et de leurs collaborateurs. Comme nous, ces auteurs ont été frappés, chez les animaux soumis à l'action de l'endotoxine typhique, par l'importance des lésions parenchymateuses et vas-

(7) Ces *Annales*, 1947, **73**, 565.

(8) Recherches encore inédites. Voir aussi R. GODEL, *Arch. Mal. Cœur et Vaisseaux*, 1948, **41**, 43.

(9) P. BOQUET, A. DELAUNAY, Y. LEHOULT et J. LEBRUN, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 269.

(10) J. REILLY et R. LAPLANE, *Encyclop. Médic. Chirurg.*, 1945.

(11) P. GASTINEL et J. REILLY, *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **134**, 456.

(12) R. LAPLANE, *Les hémorragies intestinales de la fièvre typhoïde*, Thèse médecine, Paris, 1936.

culaires. Ils ont signalé de même l'atteinte précoce des lymphocytes et les réactions réticulo-conjonctives secondaires. Comme eux, nous n'hésitons pas aujourd'hui à reconnaître que, dans ces processus divers, les troubles circulatoires exercent un rôle fondamental.

Les travaux étrangers, sur la même question, ne sont pas moins intéressants à considérer. Certains filtrats microbiens, injectés chez des animaux atteints de tumeurs, déterminent souvent au niveau de celles-ci une nécrose hémorragique considérable. P. A. ZAHl, ayant recherché la nature du principe actif, a fini par découvrir, dans la plupart des cas, un complexe polysaccharidique du type des antigènes glucido-lipidiques de A. Boivin (13). M. J. Shear, poussant plus loin encore les investigations en ce domaine, a tenté de se servir de polysaccharides microbiens toxiques comme agents thérapeutiques anticancéreux (14). Il a étudié surtout le polysaccharide du *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*) et il a injecté ce dernier chez des souris qui avaient au préalable reçu sous forme de greffes des sarcomes ou des épithéliomas. Très souvent, il a pu déterminer une véritable régression des tumeurs et ces résultats spectaculaires justifieraient même l'emploi de ce corps en clinique humaine, au même titre que la colchicine, l'uréthane et l'ypérite — autant de poisons lymphocytaires, remarquons-le en passant — si les endotoxines, en général, n'étaient pas extrêmement toxiques chez l'homme. Un élève de Shear, Gl. H. Algire, a examiné enfin le mécanisme de l'action anticancéreuse de l'endotoxine du *B. prodigiosus* (15). D'après lui, ce corps n'exerce aucune action cytotoxique directe ; c'est essentiellement au moyen des réactions vasculaires qu'il détermine, qu'il finirait par produire la mort des cellules malignes (16).

Ainsi, la part prépondérante prise par les troubles circulatoires dans la genèse des lésions endotoxiques se trouve à l'heure

(13) P. A. ZAHl et coll., *Proceed Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1942, **51**, 285 ; 1943, **52**, 116, 364 ; 1943, **54**, 48, 137, 187, 329 ; 1944, **56**, 153 ; *Am. J. Hyg.*, 1942, **36**, 124 ; 1944, **39**, 189 ; 1945, **41**, 41, etc...

(14) M. J. SHEAR et coll., *Am. J. Cancer*, 1935, **25**, 66 ; *J. Nat. Cancer Inst.*, 1943, **4**, 81, 99, 107, 123, etc...

(15) Gl. H. ALGIRE, Fr. Y. LEGALLAIS et H. D. PARK, *J. Nat. Cancer Inst.*, 1947, **8**, 53.

(16) Une autre toxine microbienne a été employée récemment dans le traitement expérimental de tumeurs cancéreuses. C'est la toxine produite par *Clostridium histolyticum*. D'après R. C. PARKER, H. C. PLUMMER, Ch. O. SIEBENMANN et M. G. CHAPMAN (*Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **66**, 461), ce poison exercerait parfois des effets favorables. Son action serait en partie directe, en partie indirecte, par déclenchement de troubles circulatoires.

actuelle unanimement reconnue. Cela ne signifie pas cependant que le problème tout entier soit résolu. Il nous paraît encore indispensable de préciser un certain nombre de points :

1° De quelle nature sont les troubles circulatoires qui provoquent la mort des tissus ?

2° Quelle est la cause de ces troubles ?

3° Quel est leur mode d'action ?

Nos recherches personnelles nous aideront à répondre à ces diverses questions.

IV. — Selon nous, deux ordres de perturbations vasculaires jouent un rôle décisif dans le déclenchement des lésions cellulaires (lymphocytaires ou autres). Il s'agit : 1° de troubles vasomoteurs artériolaires ; 2° de modifications survenues dans la circulation et la perméabilité capillaires. Nous les étudierons successivement.

I. — TROUBLES VASOMOTEURS ARTÉRIOLAIRES.

L'existence, au cours de l'intoxication typhique expérimentale, de troubles vasomoteurs artériolaires, déjà suspectée par J. Reilly et ses collaborateurs, a été démontrée récemment par nous-mêmes d'une manière irréfutable. Ces réactions vasomotrices, nous les avons constatées à la fois, chez le lapin, le cobaye et la souris, soit au niveau de la circulation périphérique (tissu conjonctif de l'oreille), soit sur le mésentère. Nous avons donné ailleurs nos techniques expérimentales (17). Nous ne ferons que rapporter ici nos observations. Quelques minutes après l'injection intraveineuse d'une dose sublétales d'entoxine typhique, le courant sanguin s'accélère. En même temps, le long des artères de moyen calibre et des artérioles, surviennent des contractions dont l'amplitude est variable — il n'est pas rare qu'elle soit très grande et qu'elle aboutisse à une obstruction totale de la lumière vasculaire — et qui frappent un segment de vaisseau plus ou moins grand. Ces contractions, qui se produisent également, mais avec beaucoup moins de violence dans le système veineux, se maintiennent pendant un certain temps (une ou deux minutes), puis elles cèdent en faisant place à une vasodilatation qui est accompagnée, en général, d'un ralentissement du courant. Parfois, cette dilatation atteint un degré très marqué. La circulation se ralentit alors à l'extrême ; elle peut même s'arrêter. Elle reprend brusquement au bout de quelques minutes, lorsque naît une nouvelle vague de contractions. Les phénomènes se renouvellent ainsi un grand nombre de fois pendant que l'intoxication progresse. Leur rythme est tantôt lent, tantôt accéléré. A la phase

(17) A. DELAUNAY et coll., *J. Physiologie*, 1948, 40, 89.

terminale de l'intoxication, cependant, l'amplitude et la fréquence des contractions vasculaires diminuent. Finalement, une vasodilatation généralisée et durable prend place. La circulation se ralentit de plus en plus. Elle s'arrêtera peu de temps avant la mort de l'animal.

Nous avons rencontré cette série de réactions chez tous nos animaux d'expérience : lapins, cobayes et souris. Elles existaient aussi bien sur le mésentère que dans le tissu conjonctif sous-cutané. Elles pouvaient être plus ou moins intenses, mais elles ne faisaient jamais défaut. Elles étaient d'ailleurs régulièrement accompagnées par une leucopénie sanguine, par une inhibition de la diapédèse et un refroidissement marqué des téguments.

Qu'elles soient une conséquence de l'intoxication, cela n'est pas douteux, puisque nous ne les avons jamais provoquées par une simple injection intraveineuse d'eau physiologique. Nous avons montré ailleurs (17) combien les phénomènes vasomoteurs que l'on voit au cours de l'intoxication typhique ressemblent à ceux qui apparaissent chez les sujets victimes d'un choc (traumatique, hémorragique, anaphylactique...). Il s'agit toujours d'une atteinte presque exclusive des artérioles et d'une vasoconstriction qui évolue par vagues successives. Il nous paraît inutile de revenir sur ce point.

II. — TROUBLES DE LA CIRCULATION ET DE LA PERMÉABILITÉ CAPILLAIRES.

a) Nous avons recherché naturellement si le système capillaire, chez les animaux intoxiqués par le poison typhique, était aussi le siège de phénomènes vasomoteurs. Mais, cette fois, nos observations ont toutes donné des résultats négatifs : nous n'avons jamais remarqué de contractions ou de dilatations capillaires. Le fait, tout d'abord, nous a un peu surpris. Il cesse pourtant d'étonner lorsqu'on prend connaissance des publications étrangères. Ainsi, Gl. H. Algire a souligné, lui aussi, l'absence de toute dilatation capillaire chez les animaux traités par l'endotoxine du *B. prodigiosus* ; ses examens portaient à la fois sur du tissu normal (muscle strié) et sur une tumeur transplantée (sarcome). De même, tous les auteurs qui ont étudié, au cours de ces dernières années, les troubles circulatoires chez les sujets en état de choc ou chez des brûlés (17) sont d'un avis unanime : ils ont tous été frappés par la netteté des réactions vasomotrices artérielles et par le maintien du diamètre normal des capillaires.

Toutefois, si les troubles vasomoteurs capillaires faisaient défaut chez nos animaux d'expérience, la *circulation sanguine*, dans ce réseau vasculaire, n'en était pas moins *fortement perturbée*. Elle frappait par son irrégularité. Tantôt, elle était extrêmement

rapide ; dans ce cas, les leucocytes roulaient anormalement vite sur les parois endothéliales ou au milieu des globules rouges. Tantôt, elle s'arrêtait quasi complètement et le sang stagnait dans les veines. Toutes ces variations paraissent dépendre essentiellement des modifications artériolaires. En général, la circulation capillaire atteint sa vitesse la plus grande lorsque commence une vague de contraction artériolaire ; elle s'arrête lorsque la vasodilatation secondaire touche à son maximum.

Ajoutons encore que les troubles du courant sanguin ne sont pas identiques, à un moment donné, dans tout le réseau capillaire ; nous avons vu très fréquemment, côte à côte, des vaisseaux où le sang circulait et d'autres vaisseaux où les globules étaient immobiles. Ce fait a été signalé également par Gl. H. Algire (15).

b) Au cours de l'intoxication typhique, en dehors des troubles de la circulation capillaire proprement dite que nous venons de mentionner, apparaissent aussi des changements importants de la membrane capillaire elle-même. Ils se traduisent par des *modifications de la perméabilité*. C'est ce qu'indiquent, pour le territoire cutané, les expériences suivantes.

Des cobayes traités par une forte dose d'endotoxine typhique administrée par voie intrapéritonéale et des cobayes normaux reçoivent, en même temps : 1° par voie intracutanée abdominale, 0,5 cm³ de bouillon stérile ; 2° dans la veine, 4/10 de centimètre cube d'une solution de bleu trypan à 1 p. 100. Une demi-heure plus tard, on note chez les animaux normaux une accumulation du bleu trypan (coloration bleue intense) dans le territoire cutané qui a reçu le bouillon. Chez les cobayes intoxiqués au contraire, et au même moment, l'accumulation du bleu trypan dans la région enflammée est très peu marquée, et elle est d'autant moins marquée que l'animal est plus malade. Au cours des heures qui suivent, le tégument tout entier des cobayes normaux se colore peu à peu en bleu, cependant que la peau des cobayes intoxiqués reste pâle.

La pâleur des téguments observée en ce cas indique classiquement une *diminution de perméabilité du réseau capillaire cutané*, et nous pensons que cette diminution existe effectivement. On pourrait objecter qu'elle tient aussi à une circulation générale défectueuse, conséquence des perturbations artériolaires. Nous répondrons à cette réserve que cette dernière cause, si elle existe, n'est certainement que secondaire attendu que nous avons montré, par des mesures précises, que pendant toute la durée de l'intoxication, sauf à la phase finale, la vitesse de la circulation cutanée, *dans son ensemble*, n'est pas sensiblement modifiée. En tout cas, la perméabilité capillaire est certainement diminuée, dans la peau, pour les leucocytes puisque, après injection d'une dose convenable d'endotoxine, la diapédèse ne se produit plus.

La perméabilité capillaire, chez les animaux intoxiqués, est-elle également diminuée dans les *territoires profonds*? Certainement oui, en ce qui concerne les globules blancs, puisque l'inhibition de la diapédèse peut s'observer en tous points de l'organisme. Il est plus difficile d'énoncer un avis sur la perméabilité aux colloïdes. A cet égard, le bleu trypan ne nous a donné aucun renseignement précis. Sur coupes de tissus, on trouve de l'œdème, mais celui-ci peut traduire aussi bien une destruction véritable de la paroi capillaire qu'une simple modification physico-chimique de porosité de la membrane endothéliale.

V. Considérons maintenant les différentes causes possibles de ces troubles circulatoires.

I. — CAUSES DES TROUBLES ARTÉRIOLAIRES.

En principe, ces troubles peuvent relever d'un double mécanisme : nerveux ou humoral.

a) Le mécanisme nerveux mettrait essentiellement en jeu le système neuro-végétatif, sympathique et parasympathique. Comme on le sait, son intervention, à l'origine des troubles vasomoteurs en général et dans l'intoxication typhique en particulier, est admise par J. Reilly et P. Gastinel, et ces auteurs, à l'appui de leur thèse, ont déjà réuni un grand nombre d'arguments valables.

b) Cependant, en faveur de l'existence d'un *mécanisme humoral*, existent des faits non moins probants. L'un d'eux nous paraît même décisif : les troubles vasomoteurs artériolaires, chez les lapins traités par l'endotoxine typhique, se produisent aussi bien sur des oreilles énervées (par arrachement du sympathique cervical) que sur des oreilles normales (observations personnelles). Une hormone, surtout, jouerait ici un rôle de premier plan : c'est l'*adrénaline*.

De nombreux troubles métaboliques — entre autres, l'hyperglycémie — attestent, en effet, qu'au cours de l'intoxication typhique expérimentale, une forte quantité d'adrénaline se trouve brusquement libérée. Ce phénomène, d'ailleurs, ne doit pas surprendre puisque des décharges adrénaliniques sont de règle chez les sujets choqués ou intoxiqués, pourvu que l'intoxication soit brutale (18).

Mais peut-on mettre sur le seul compte de l'hyperadrénalinémie tous les troubles circulatoires qui caractérisent les états de choc ou une intoxication? A. Penner et A. I. Bernheim le pensent (19).

(18) Fr. CONTAMIN, *Sem. Hôpitaux*, 1948, **83**, 2690.

(19) A. PENNER et A. I. BERNHEIM, *J. exp. Med.*, 1939, **70**, 453 ; *Arch. Path.*, 1939, **28**, 129 ; 1940, **30**, 465, etc.

Ces deux auteurs, ayant pu reproduire expérimentalement, au moyen d'injections répétées d'adrénaline, des lésions comparables à celles qui se produisent pendant les chocs, ont admis que ces dernières étaient essentiellement provoquées par une vaso-constriction artériolaire d'origine adrénalinique. Dans un travail plus récent (20), qui avait précisément pour but de déceler le mode d'action, *in vivo*, d'une endotoxine (celle du B. de Shiga), Penner et Bernheim sont revenus sur cette action hormonale : dans la genèse des lésions endotoxiques, ils ont fait jouer, cette fois encore, le rôle primordial à des troubles vasomoteurs adrénaliniques.

Cette conception est certes séduisante. Nous avons pu nous-mêmes déterminer, avec l'adrénaline, des lésions lymphocytaires identiques à celles que donne une endotoxine (2). Cependant, il nous paraît difficile, sinon impossible, de penser que ce corps agit seul. L'intoxication adrénalinique expérimentale n'est pas comparable, point par point, à celle qui suit l'injection de l'extrait bactérien. Dans la première, on trouve une hyperleucocytose, dans la seconde, une leucopénie. En outre, on empêche l'inhibition locale de la diapédèse que produit l'adrénaline en ajoutant à l'hormone du tartrate d'ergotamine ; or, cette substance ne parvient jamais à rétablir la diapédèse, au cours de l'intoxication typhique.

Selon toute vraisemblance, chez les animaux intoxiqués, d'autres hormones, d'autres principes dissous joignent leur action à celle de l'adrénaline. Peut-être s'agit-il de rénine, d'angiotensine... C'est ce que nous cherchons à l'heure actuelle. De toute façon, on peut déjà éliminer, sur la foi de recherches personnelles qui seront rapportées en détail ultérieurement, une mise en jeu d'histamine ou d'adrénoxine.

c) Est-il nécessaire de chercher à délimiter très précisément, dans le déterminisme des troubles vasomoteurs artériolaires que nous étudions ici, ce qui revient en propre au mécanisme nerveux ou au mécanisme humoral ? Nous ne le pensons pas. Système neuro-végétatif et glandes à sécrétion interne confondent trop souvent leurs effets. Ils forment en réalité un ensemble qu'il serait vain de dissocier (21). Nous dirons donc, en conclusion de ce paragraphe, que les troubles vasomoteurs artériolaires, chez les animaux intoxiqués par une endotoxine, ne sont qu'une conséquence des perturbations du système neuro-endocrinien.

(20) A. PENNER et A. I. BERNHEIM, *J. exp. Med.*, 1942, 76, 271.

(21) L. HEILMEYER, *Précis de Physiologie pathologique*, 1 vol., Vigot, édit., 1946.

II. — CAUSES DES TROUBLES DE LA CIRCULATION ET DE LA PERMÉABILITÉ CAPILLAIRES.

L'irrégularité du courant sanguin intracapillaire, nous l'avons déjà mentionné, paraît dépendre avant tout des modifications artériolaires. Nous rechercherons donc simplement ici les causes du *changement de perméabilité*.

Aucune raison ne permet d'incriminer un facteur nerveux. Nos connaissances sur l'innervation des capillaires laissent d'ailleurs beaucoup à désirer.

A notre avis, deux facteurs exerceraient ici une action capitale : des hormones, l'anoxie.

a) LES HORMONES. — Certaines hormones sont capables de diminuer la perméabilité capillaire. Des travaux récents ont souligné à cet égard l'importance de l'adrénaline (22) et des hormones cortico-surrénales (23). Or, nous le savons à présent (2), tous ces principes sont produits en quantité dans l'intoxication typhique expérimentale. Pour cette raison, nous mettons sous leur dépendance la diminution de perméabilité des capillaires cutanés que nous avons signalée plus haut.

Les différentes hormones surrénales, avons-nous montré dans un travail précédent (2), n'ont aucun pouvoir lymphotoxique direct. Pourtant, injectées dans l'organisme, elles déterminent de profondes lésions lymphocytaires. Sans doute, n'exerce-t-elles cette action qu'à la faveur de troubles circulatoires divers. Telle est du moins notre explication.

Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que les produits lymphotoxiques les plus couramment utilisés : *colchicine*, *uréthane*, etc., sont tous capables de provoquer des troubles de la perméabilité (24). On peut se demander, toutefois, s'ils les provoquent directement ou par l'intermédiaire d'hormones.

b) L'ANOXIE. — Par suite de l'irrégularité du courant sanguin dans les artérioles et dans les capillaires, un état d'anoxie au moins partielle est certainement créé dans les tissus, au cours de l'intoxication typhique. Or, l'anoxie, à elle seule, influence la perméabilité capillaire ; on admet généralement qu'elle l'augmente (24). Elle oppose donc son action à celle des hormones.

On voit dès lors combien les phénomènes qui se déroulent in

(22) D. G. EVANS, A. A. MILES et J. S. F. NIVEN, *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 20.

(23) R. CHAMBERS et B. W. ZWEIFACH, *Phys. Rev.*, 1947, **27**, 436, R. CACHERA, *Sem. Hôp. Paris*, 1947, **41**, 2469.

(24) E. GELLHORN et J. REGNIER : *La Perméabilité en Physiologie et en Pathologie générale*, 1 vol., Masson, édit., 1936.

vivo doivent être complexes. Dans son ensemble la perméabilité est, sans nul doute, considérablement modifiée, mais elle ne l'est pas dans le même sens en tous points. Ici, elle sera augmentée, là diminuée, ces variations tenant à des différences de structure capillaire ou de texture tissulaire.

Il serait certes important de connaître le degré de perméabilité vasculaire non plus seulement dans la peau mais aussi dans l'intimité de chaque organe. Cette tâche sera peut-être accomplie. Aujourd'hui, malheureusement, elle se heurte encore à des difficultés techniques quasi insurmontables.

VI. — Nous abordons à présent la partie de notre discussion qui est la plus délicate. Nous savons qu'au cours de l'intoxication typhique expérimentale, existent des troubles circulatoires importants. Nous estimons que ces troubles jouent un grand rôle dans le déclenchement des altérations cellulaires, surtout lymphocytaires, qui surviennent pendant cette intoxication. *Comment exercent-ils leur action nocive ?*

La plupart des auteurs qui ont recherché le mode de production des lésions ischémiques ont mis en cause la gêne apportée à la nutrition des cellules. Dans un gros travail récent, G. Tardieu et C. Tardieu se sont faits les ardents défenseurs de cette pathogénie (25). De même, on a signalé le rôle nuisible de l'anoxie. Ces causes sont certainement valables. Néanmoins, troubles nutritifs et troubles anoxiques, à eux seuls, nous paraissent tout à fait incapables d'expliquer la *rapidité d'installation* et l'*intensité* des lésions observées en ce cas (on a l'impression d'une véritable « flambée » cellulaire). Pour s'en assurer, il suffit d'étudier les processus d'autolyse cellulaire normaux qui se déroulent, chez l'animal, après la mort. On remarque d'abord que ce processus est relativement lent ; il faut attendre plusieurs jours avant d'observer, dans le tissu lymphoïde, un nombre appréciable de pycnoses. En outre, la mortification du tissu, chez le cadavre, ne se fait pas du tout comme chez l'animal atteint de troubles circulatoires, secondaires ou non à une intoxication. Chez celui-là, ce qui apparaît en premier lieu, c'est une fluidification de la trame conjonctive ; les cellules, morphologiquement intactes à ce moment, paraissent flotter dans le liquide. Au contraire, chez le second, la trame reste longtemps inaltérée ; la lésion est *d'abord une lésion cellulaire*.

Par diverses expériences nous avons pu préciser davantage ces premières données.

a) Nous avons maintenu à l'étuve à 37° et en eau physiologique des ganglions et la rate prélevés aseptiquement chez des cobayes

(25) G. TARDIEU et C. TARDIEU. *Le système nerveux végétatif*, 1 vol., Masson, édit., 1948.

et des souris, puis, au bout de délais variables, nous avons fixé et inclus ces pièces pour y rechercher les lésions. En opérant dans ces conditions, même au bout de vingt-quatre heures, nous n'avons jamais remarqué de lésions lymphocytaires nettes. Or, on se rappelle que, dans le même laps de temps, chez la souris intoxiquée par une endotoxine, les pycnoses sont innombrables. Pour obtenir, *in vitro*, des pycnoses lymphocytaires importantes, il faut se servir de lymphocytes isolés, en suspension dans du sérum ou de l'eau physiologique. Dans ce cas, les altérations observées sont tout à fait semblables à celles qui apparaissent *in vivo*. Toutefois, elles ne se produisent pas plus rapidement.

b) Dans une autre série d'expériences, nous avons introduit sous la peau de cobayes sacrifiés (immédiatement ou depuis vingt-quatre heures) une suspension lymphocytaire en sérum sanguin. Sept heures plus tard, nous avons prélevé la peau injectée. Sur coupes de ce tissu, nous avons retrouvé des *lymphocytes absolument intacts*. Le manque de matières nutritives apportées par le sang, le manque d'oxygène, avaient pourtant été absolus. Ces carences ne suffisent donc pas à expliquer la lyse lymphocytaire *extraordinairement rapide* qui prend place, chez l'animal vivant, dans un tissu rendu ischémique par une injection d'adrénaline.

En ce cas, quel mécanisme faut-il mettre en cause ? Nous penserions volontiers au suivant.

Les troubles circulatoires se borneraient à *dérégler le métabolisme cellulaire*, mais ce dérèglement aurait plusieurs conséquences.

1° La cellule, manquant partiellement ou totalement de matériaux nutritifs ou d'oxygène, serait désormais incapable d'effectuer convenablement les processus normaux, intracytoplasmiques, de synthèse. Les cellules souches seraient atteintes naturellement les premières ; de fait, c'est à leur niveau qu'on note les altérations les plus précoces. En outre, le dérèglement du métabolisme serait accompagné par le rejet dans le milieu ambiant de métabolites divers. Par suite du drainage insuffisant (lymphatique et veineux) du système lacunaire, ces métabolites ne seraient pas éliminés ; ils contribueraient par là même à hâter la mort de la cellule.

Qu'un mécanisme de cet ordre se produise effectivement, on ne peut guère en douter. La déficience du drainage local est établie par la présence d'œdème ; l'existence de métabolites cytotoxiques libérés par les cellules elles-mêmes est, d'autre part, démontrée chaque jour par la pratique des cultures de tissus : si l'on ne prend pas soin de changer régulièrement les milieux de cultures, les tissus ne manquent jamais de dégénérer et de mourir.

2° Cependant, ces diverses réactions ne sont certainement pas seules en jeu. Elles correspondent, en effet, à un processus d'autolyse banale ; or, celui-ci est habituellement lent. Sans aucun doute, d'autres facteurs interviennent pour hâter son évolution dans les tissus ischémiés. Nous pensons qu'ils sont amenés par le sang (il est extrêmement rare que l'irrigation sanguine soit totalement interrompue dans un territoire ; ainsi, elle est irrégulière mais elle persiste dans le cas le plus fréquent ; ischémie par troubles vaso-moteurs).

Ces facteurs seraient de nature chimique. Ils auraient une origine exogène (produit toxique injecté ; il s'agirait, par exemple, d'une endotoxine) ou endogène (hormones, métabolites etc.). Tous ces produits seraient impunément supportés par des cellules normales. En revanche, ils deviendraient nocifs pour des éléments mis en état de moindre résistance par des altérations de leur métabolisme. En un mot, ces éléments se trouveraient sensibilisés à leur action.

Une telle explication a du moins l'avantage de faire comprendre pourquoi il est presque toujours indispensable, pour tuer des cellules *in vitro*, d'employer des doses beaucoup plus considérables d'un produit toxique que celles qui sont requises pour obtenir le même effet *in vivo*. C'est que celles-là sont encore intactes alors que les autres ont été déjà rendues fragiles par les troubles circulatoires.

Certes, nous ne nous dissimulons pas le caractère encore très hypothétique de notre interprétation. Cependant, dans l'état actuel de nos connaissances, elle seule paraît acceptable.

Le gros problème qui maintenant devrait être résolu est le suivant : Quelle est la nature chimique exacte des différents principes cytotoxiques d'origine endogène et qui sont, soit véhiculés par le sang, soit produits dans le tissu conjonctif ? Les premiers sont sans doute représentés par des hormones. En ce moment, nous recherchons plus précisément les seconds, mais ce travail est difficile. Au cours de son autolyse, la cellule libère tant de substances qu'il est délicat de faire un tri, d'autant plus qu'on trouve en mélange des substances réellement toxiques et d'autres qui sont au contraire capables, comme les *tréphones*, d'exciter les multiplications cellulaires.

Nous avons déjà étudié l'histamine. Cette substance — du moins en cultures de tissus — n'a aucun pouvoir cytotoxique.

Il y aura lieu également de préciser, dans l'avenir, la nature du dérèglement métabolique initial qui apparaît dans les cellules au sein des tissus ischémiés.

VII. — Arrivés à ce point de nos recherches, nous concevons de la façon suivante le *mode d'action générale des endotoxines bactériennes*.

Aussitôt après leur introduction dans l'organisme, ces poisons diffuseraient par les voies lymphatique et sanguine et ils iraient impressionner les centres nerveux. L'atteinte primitive de ces centres est rendue vraisemblable par les observations de J. Reilly et P. Gastinel sur le neurotropisme électif des endotoxines et de G. Tardieu sur les comas (26). Elle est aussi indiquée par les altérations du système nerveux que l'examen histologique met en évidence dans ce cas (27).

Les centres nerveux, impressionnés, réagiraient par divers stimulus. Il y aurait notamment une brusque libération intravasculaire d'adrénaline qui viendrait elle-même exciter l'activité hypophysaire. Finalement, l'organisme serait le siège d'une véritable dysharmonie endocrinienne avec, comme conséquence majeure, les troubles circulatoires que nous venons d'étudier.

Une telle réaction, chez le sujet intoxiqué, doit-elle être considérée comme un acte de défense ? Bien qu'il soit toujours délicat de faire valoir des arguments téléologiques, nous serions enclins, avec W. B. Cannon, à le croire (28). Cette réaction, limitée, ne peut être qu'utile ; on le voit bien d'ailleurs par l'action bénéfique qu'exerce généralement l'injection d'une dose physiologique d'adrénaline. Cependant, elle pourrait aussi devenir nuisible. Trop violente, elle dépasserait en somme son but. Loin d'aider l'organisme, elle finirait alors par le conduire dans un état désespéré. Nous pensons effectivement que, dans l'intoxication typhique expérimentale, les troubles métaboliques, les altérations tissulaires, la mort même, sont moins le fait d'une toxicité primaire de l'endotoxine que le résultat d'une réaction d'alarme excessive.

Nous venons d'écrire : *réaction d'alarme*. C'est que nous partageons en effet l'opinion de H. Selye sur l'existence d'un mode de défense non spécifique et absolument général. Cependant, nous nous éloignons, sur un point important, de la conception de l'auteur canadien, ou plutôt nous sentons la nécessité de la compléter. Pour Selye, des hormones, seules, joueraient ici le rôle capital. Pour notre part, nous pensons que les troubles circulatoires, par eux-mêmes et qu'ils soient ou non provoqués par des médiateurs chimiques, exercent une action non moins nette. D'après Selye, les modifications métaboliques seraient directement réglées par des hormones. Nous estimons qu'il serait plus juste de les considérer, dans un grand nombre de cas, simple-

(26) G. TARDIEU, *Pr. Méd.*, 1942, nos 7-8, 75.

(27) C. BONCIU et Gh. ISTRATI, *Arch. Roum. Path. exp. et Bact.*, 1945, 14, 73.

(28) W. B. CANNON, *The Wisdom of the Body*, 1 vol., Kegan, édit., 1947.

ment comme une œuvre des perturbations vasculaires. Celles-ci, dans les formes les plus graves, suffisent à engendrer une série de troubles qui conduisent peu à peu, par une sorte de cycle vicieux, jusqu'à l'épuisement définitif du sujet intoxiqué.

L'organisme ne possède certainement pas à sa disposition toute une gamme de moyens de défense. Sa façon de réagir localement le prouve assez bien. Observons la réaction inflammatoire. Quel que soit sa cause — et, en fait, les agents les plus différents peuvent la déclencher — elle évolue toujours dans le même sens. Elle garde toujours la même physionomie. On note tout d'abord l'afflux des polynucléaires, puis la multiplication des macrophages, enfin l'apparition d'un tissu scléreux. Chacun de ces stades peut être exagérément marqué ou prolongé. Cependant, le schéma général du processus ne varie pas. Il en est certainement de même lorsque la réaction cesse d'être locale pour devenir générale, lorsque l'organisme tout entier doit brusquement s'adapter à des conditions nouvelles pour lui.

H. Selye a bien montré que, dans ce cas, l'organisme réagit toujours par la mise en activité de son système endocrinien (tout spécialement des capsules surrénales). Il n'est pas moins facile d'établir qu'il réagit également toujours par des modifications vasculaires. Nous avons étudié, dans ce travail, les troubles circulatoires chez des sujets intoxiqués par une endotoxine. Nous les avons définis, analysés. Hâtons-nous d'ajouter qu'ils n'ont rien de spécifique. En réalité, on les retrouve, sous une forme presque identique, chez tous les sujets victimes d'un choc, chez les brûlés, chez les intoxiqués (17). Notamment, on retrouve toujours ces ondes de vaso-constriction artériolaire, ces modifications de la circulation et de la perméabilité capillaires. Corrélativement, on observe aussi, et avec des différences de détail à peine perceptibles, des lésions tissulaires. Nous mettons donc celles-ci, en tous cas et sans hésiter, sur le compte des troubles circulatoires. On peut se demander pourquoi elles sont ordinairement les plus marquées au niveau des organes lymphoïdes (29). Cette particularité tient sans doute à la fragilité des lymphocytes (que l'on constate aisément dès qu'on veut soumettre ces cellules à des expériences *in vitro*) et aussi à la structure particulière du tissu conjonctif dans les ganglions, le thymus et la rate.

Une mention spéciale doit être faite ici des *lésions allergiques*. Celles-ci ont-elles régulièrement pour facteurs des troubles vasculaires ? Nous le croyons. L'existence de ces troubles, dans les chocs anaphylactiques, et en particulier de réactions vaso-

(29) La fréquence des lésions lymphocytaires chez les animaux traités par une endotoxine vient d'être remarquée encore par : A. ANGRIST et M. MOLLOY, *Amer. J. Med. Sci.*, 1948, **215**, 149.

motrices, a déjà été démontrée par différents auteurs (30). Tout un chapitre de l'allergie s'éclaire dans ces conditions. Seul, ce qui reste obscur, c'est le *primum moriens* de la réaction, c'est ce qui rend nocif un antigène qui était jusqu'alors dépourvu de toute toxicité.

Le rôle des troubles circulatoires, dans la production de lésions aiguës et diffuses apparaît ainsi considérable (31). Nous aurons, plus tard, l'occasion de montrer qu'il n'est pas moins grand dans la genèse de certaines affections chroniques : cirrhose, artériosclérose...

Reste à envisager le cas particulier de quelques lésions tissulaires, ou plutôt cellulaires, qui paraissent résulter de l'action directe d'un produit toxique, type colchicine, ypérite, uréthane, etc... Que ces produits soient de véritables poisons pour la cellule (poison nucléaire ou poison cytoplasmique), le fait est certain. Il a été démontré trop de fois, *in vitro*, au moyen des cultures de tissus. On sait également à quelles belles applications l'emploi de la colchicine a conduit les botanistes.

Mais cela suffit-il pour admettre que les lésions que produisent *in vivo* les mêmes poisons se font tout à fait indépendamment des vaisseaux ? Rien n'est moins sûr. C'est ce que nous établirons dans notre prochaine communication.

RÉSUMÉ.

Les lésions cellulaires, surtout lymphocytaires, qui surviennent chez les sujets intoxiqués par une endotoxine, paraissent déterminées par des troubles circulatoires, en particulier des troubles vaso-moteurs artériolaires et des modifications de la circulation et de la perméabilité capillaires.

Les auteurs ont recherché la cause de ces différents troubles, leur mode d'action et ils ont souligné leur importance en pathologie.

(30) L. PASTEUR VALLERY-RADOT et coll., *L'anaphylaxie expérimentale et humaine*. 1 vol., Masson, édit. ; R. G. ABELL et H. P. SCHENCK, *J. Immunol.*, 1938, **34**, 195 ; etc.

(31) Consulter par exemple H. BETZ, *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 868 ; A. LAMBLING, *Prog. Med.*, 1948, **3**, 54 ; P. KIMMELSTIEL, *Amer. J. Med. Sci.*, 1948, **216**, 11 ; etc.

RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES SUR LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

VIII. — ACTION DE DIVERS SÉRUMS NORMAUX OU ANTICHARBONNEUX SUR LE POUVOIR VACCINANT DES FILTRATS DE CULTURE (PLASMA CULTURE FILTRATE) DE GLADSTONE

par ANNE-MARIE STAUB (*) (1).

(*Medical Research Council, Unit for bacterial Chemistry
Lister Institute, Londres.*)

INTRODUCTION.

Dans un mémoire précédent [6], P. Grabar et nous-même avons signalé l'action des euglobulines « non protectrices » d'un sérum de cheval anticharbonneux sur l'activité vaccinnante du liquide d'œdème charbonneux stérile. Nous avons constaté qu'en éliminant par ces euglobulines (dénudées de toute activité protectrice sur le cobaye) les antigènes précipitants présents dans le liquide d'œdème, on supprimait l'activité vaccinnante de ce produit. Nous en avons conclu que l'antigène vaccinnant était parmi les antigènes précipitants, et, nous appuyant sur certains résultats antérieurs [5], nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'un glucoprotéide vaccinnant.

Néanmoins, les difficultés rencontrées lors de ce travail pour se procurer des cobayes nous avaient empêchés de l'approfondir autant que nous l'aurions voulu. Les intéressants résultats de Gladstone [4] permettent à présent d'obtenir *in vitro* l'antigène charbonneux vaccinnant, dont la seule source avait été jusqu'ici le liquide d'œdème. Il nous a donc été possible de reprendre en Angleterre les premières expériences faites avec le liquide d'œdème, mais cette fois avec le filtrat de culture vaccinnant

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 janvier 1949.

(1) Actuellement : Service des Vaccins Virus, Institut Pasteur, Paris (XV^e)

désigné par Gladstone P. C. F. (2). Nous exposons ici les résultats de cette étude, au cours de laquelle nous nous sommes heurtée à des difficultés imprévues et qu'il nous a semblé intéressant de signaler.

MATÉRIEL.

Filtrats de culture vaccinants [P. C. F. (2)].

Nous avons travaillé avec deux sortes de P. C. F. : les uns, obtenus par culture ordinaire du *B. anthracis* en sérum de mouton, puis filtration de la culture après dix-huit à vingt heures de séjour à l'étuve à 37° [1] seront appelés « P. C. F. faibles », les autres, obtenus par culture dans le même sérum, mais dans un sac de « cellophane » suspendu dans du bouillon nutritif constamment renouvelé suivant la technique décrite par Gladstone [2] seront appelés : « P. C. F. forts ».

« P. C. F. L_3 ». — C'est une variante des P. C. F. faibles où, au lieu de cultiver les bactériidies dans un sérum de mouton ordinaire, on modifie préalablement celui-ci de la façon suivante : on dissout, dans un volume V de sérum de mouton, les euglobulines précipitées d'un volume 3 V de sérum de cheval par addition d'eau distillée saturée de CO_2 , suivant la technique utilisée avec des sérums anticharbonneux [4]. On chauffe ensuite la solution une heure dans un bain-marie à 56°.

Souche de B. anthracis.

La souche utilisée pour la préparation des divers P. C. F. est celle appelée « Weybridge » par Gladstone [1] : elle est sporogène, avirulente, acapsulée et immunisante pour le mouton, le lapin, le cobaye, mais non pour la souris.

Sérums anticharbonneux (3).

Sérum de cheval « 1310 ». — C'est un sérum fortement protecteur et précipitant, préparé de la manière suivante [14]. Des inoculations hebdomadaires de bactériidies vivantes acapsulées (souche préparée suivant le procédé Stamatin) sont pratiquées dans la veine et sous la peau à des doses croissantes qui, partant de 10 cm³ de culture en bouillon, atteignent lentement en deux mois la récolte d'une culture sur gélose correspondant environ au tiers d'une boîte de Roux.

(2) Suivant les initiales de « Plasma Culture Filtrate », les premiers résultats avant été obtenus par culture sur plasma. Dans la suite, le plasma a été remplacé par du sérum (Cf. Matériel).

(3) Les deux sérums 1310 et 751 m'ont été fournis par mon père, M. A. Staub. Qu'il trouve ici l'expression de toute mon affectueuse reconnaissance.

Sérum d'âne « 751 ». — C'est un sérum faiblement protecteur et très riche en anticorps précipitants. Le mode de production, décrit par A. Staub et ses collaborateurs [15], diffère du précédent en ce que les inoculations hebdomadaires ne sont pratiquées, cette fois, que dans la veine; elles sont, en outre, beaucoup plus importantes, puisqu'elles atteignent en deux mois la valeur d'une boîte de Roux et se maintiennent à ce taux pendant deux autres mois.

Les *euglobulines* et les *pseudoglobulines* de ces sérums ont été préparées suivant le procédé décrit dans des publications antérieures [4] (précipitation des euglobulines par 9 volumes d'eau distillée acide et dissolution dans du sérum normal. Précipitation des pseudoglobulines par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ après élimination des euglobulines).

Les anticorps « purs » ont été préparés suivant la technique de Heidelberger et Kendall [8].

25 cm³ de sérum « 751 », additionnés de 75 cm³ d'une solution de NaCl à 0,85 p. 100, sont précipités par 1 mg. de polyoside somatique charbonneux (préparé suivant la méthode de Ivanovics [10]) (4), ces proportions laissant en solution un léger excès d'anticorps. Après quarante-huit heures à +2° : centrifugation et 5 lavages par 25 cm³ de la même solution de NaCl à la même température puis mise en suspension du précipité dans 25 cm³ d'une solution de NaCl à 15 p. 100, contact pendant une heure à 30° avec agitations fréquentes; enfin centrifugation et dialyse, pendant trois à quatre jours, du surnageant contre une solution tampon de pH = 7,5 de phosphates M/15, rendue isotonique par addition de NaCl ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ M/15 : 80,8 cm³ : PO_4KH_2 M/15 : 19,2 cm³; NaCl 0,5 g.). La solution finale très claire, obtenue après centrifugation, contient, suivant les préparations, de 35 à 40 p. 100 de son azote précipitable par le polyoside somatique. Le degré de pureté de cette préparation est nettement plus faible que celui des antipolyosides pneumococciques (85 p. 100 pour SI, 52 p. 100 pour SIII [8]), mais n'a pas pu être amélioré.

Sérum de lapin anti-P. C.F. — C'est un sérum moyennement protecteur [2] qui ne précipite ni le polyoside somatique, ni le P. C. F., lorsque l'on a eu soin d'éliminer les anticorps antimouton, apparus à la suite de l'injection du sérum de mouton, milieu de base des P. C. F. Il a été obtenu par deux séries d'un mois d'injections bihebdomadaires, puis hebdomadaires de P. C. F. fort à des doses croissantes (0,25 cm³ — 0,5 — 1 — 2 cm³).

(4) Ce polyoside nous a été fourni par le Dr H. N. Rydon que nous remercions très vivement.

TECHNIQUES.

Recherche de l'équivalence. — A une série de tubes contenant un volume constant de sérum, on ajoute des volumes croissants d'antigène ; après quarante-huit heures, on centrifuge et l'on ajoute à deux fractions de chaque surnageant, soit l'antigène, soit le sérum. La présence ou l'absence de précipitation indique si l'on se trouve en présence d'un excès d'antigène ou d'anticorps. L'« équivalence » est le point où le surnageant ne précipite plus après addition soit d'antigène, soit d'anticorps.

Immunisation des lapins. — Chaque lapin reçoit trois injections sous-cutanées hebdomadaires, puis, huit jours après la dernière injection, il est éprouvé par l'injection intra-cutanée de 10^5 spores virulentes (provenant d'une souche appelée « Vollum ») en suspension dans $0,25\text{ cm}^3$ de bouillon et correspondant environ à 100 doses minima mortelles.

Protection passive. — Injection intraveineuse à des lapins de 10, 5, 2, 1 cm^3 de sérum, puis épreuve vingt-quatre heures plus tard (Cf. ci-dessus). Les sérums qui protègent tous les lapins avec 1 à 2 cm^3 sont dits *fortement* protecteurs, avec 5 cm^3 *moyennement* protecteurs, 10 cm^3 *faiblement* protecteurs.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. *Expérience avec les euglobulines 1310.*

Cette première expérience fut conduite exactement comme celles faites jadis avec le liquide d'œdème et les euglobulines d'un autre sérum de cheval anticharbonneux [6]. Afin d'éliminer tous les antigènes précipitants, il fallait travailler en excès d'anticorps. L'étude de la précipitation du P. C. F. « faible » avec les euglobulines 1310, montra qu'avec 2 cm^3 d'euglobulines pour 1 cm^3 de P. C. F., on était au point d'équivalence ; $2,7\text{ cm}^3$ d'euglobulines assuraient donc l'excès d'anticorps requis.

Voici le protocole de l'expérience. On prépare :

4 tubes A contenant chacun 1 cm^3 de P. C. F. et $2,7\text{ cm}^3$ d'une solution de NaCl à 0,85 p. 100.

4 tubes B contenant chacun 1 cm^3 de P. C. F. et $2,7\text{ cm}^3$ d'euglobulines normales (5).

4 tubes C contenant chacun 1 cm^3 de P. C. F. et $2,7\text{ cm}^3$ d'euglobulines 1310.

(5) Préparées à partir d'un sérum normal, suivant la même technique que les euglobulines spécifiques. Tous les sérums normaux utilisés au cours de ce travail m'ont été très aimablement fournis par le Lister Institute d'Elstree.

Après quarante-huit heures à la glacière, on centrifuge les tubes C qui seuls présentent une précipitation ; les liquides surnageants sont gardés séparément et les précipités soigneusement mis en suspension dans 3,7 cm³ d'une solution de NaCl à 0,858 p. 100 (D.). On injecte ensuite ces préparations à 14 lapins, suivant la technique d'immunisation décrite plus haut (des tubes cassés pendant la centrifugation n'ont permis d'immuniser que 3 lapins dans les séries C et D).

Les résultats du tableau I montrent que tous les lapins n'ayant

TABLEAU I. — Action neutralisante des Euglobulines 1310 sur le « P. C. F. ».

LAPINS	SÉRIE	NATURE DES INJECTIONS	RÉSULTATS
1 2 3 4	A	P. C. F. faible.	V (1) V V V
5 6 7 8	B	P. C. F. faible + euglobulines normales.	+ [3] (2) + [5] + [7] V
9 10 11	C	P. C. F. faible + eugl. 1310. { Surnageant.	+ [4] + [4] + [4]
12 13 14	D	{ Précipité.	+ [3] + [4] + [4]
15 16		Témoins (pas d'injections préparatoires).	+ [3] + [4]

(1) Vivants.
(2) Morts. Le chiffre entre [] indique le nombre de jours de survie.

reçu que le P. C. F. survivent (IA), alors que tous ceux ayant reçu soit le surnageant (IC), soit le précipité (D) du mélange P. C. F. + euglobulines 1310, succombent après l'épreuve, conformément aux résultats obtenus avec le liquide d'ordème et les euglobulines spécifiques utilisées alors. Mais, parmi les 4 lapins ayant reçu le mélange P. C. F. + euglobulines normales, 3 succombent aussi après l'épreuve, indiquant que le pouvoir vaccinant du P. C. F., s'il n'a pas été totalement détruit, a été fortement diminué.

II. Action des euglobulines normales sur l'activité vaccinnante du P. C. F.

L'activité d'un sérum normal sur le P. C. F. empêchait de tirer aucune conclusion de l'expérience précédente, l'élimination du pouvoir vaccinant par les euglobulines anticharbonneuses pouvant très bien n'avoir rien de spécifique. Tous nos efforts tendirent alors à supprimer cette activité non spécifique des euglobulines normales sur le P. C. F., activité que pendant près d'un an, nous avons régulièrement observée, quoique à des degrés légèrement différents (tableau II), avec les divers sérums normaux que nous

TABLEAU II. — Action neutralisante d'euglobulines « normales » sur le « P. C. F. ».

EXPÉRIENCES	PRÉPARATIONS AJOUTÉES AU P. C. F.	ANIMAUX VIVANTS ANIMAUX MORTS
1	0	4/0
2 3 4 5	Euglobulines dissoutes dans sérum.	1/3 1/3 3/1 2/2
6 7	Euglobulines dissou'es dans sérum, puis chauffées.	4/0 4/0
8 9 10	Euglobulines chauffées, dissoutes dans sérum chauffé.	2/2 2/2 3/1

avons eus entre les mains. Le chauffage (1 heure à 56°) des euglobulines normales dissoutes dans le sérum (tableau II, expériences 6 et 7) détruit leur activité. Mais le chauffage des euglobulines spécifiques en solution dans le sérum normal détruit leur propriété précipitante qu'il nous fallait de toute évidence conserver. C'est un nouvel exemple du phénomène décrit par Kleczkowski [11] à propos d'autres anticorps euglobuliniques chauffés, en présence d'albumines. Toutefois, si l'on dissout dans une solution neutre de NaCl à 0,85 p. 100 des euglobulines spécifiques soigneusement lavées dans des petits volumes d'eau distillée acide (elles y sont légèrement solubles, d'où la nécessité d'utiliser des « petits volumes »), qu'on les chauffe une heure à 56°, puis qu'après précipitation par dialyse contre de l'eau distillée, on les redissolve dans du sérum normal chauffé, on conserve le pouvoir précipitant. Nous avons donc recherché si le même procédé détruisait

encore l'activité des euglobulines normales sur le P. C. F.. L'expérience prouva qu'il n'en était rien (II, 8, 9, 10).

Ces résultats n'ayant pas encore résolu le problème, nous avons essayé de modifier le milieu de culture du *B. anthracis*. L'une de nos préparations appelée L3 (Cf. Matériel) semblait donner de bons résultats ; le P. C. F. obtenu à partir de cette préparation n'était plus sensible à l'action des euglobulines normales préparées à partir d'un nouveau sérum normal, mais une expérience de contrôle nous montra que ces nouvelles euglobulines normales ne modifiaient plus l'activité du P. C. F. faible ordinaire. Néanmoins, par prudence, toutes les expériences ultérieures effectuées avec des P. C. F. faibles le furent avec des préparations L3.

III. Action du sérum 751 et de ses fractions sur le pouvoir vaccinant du P. C. F.

Puisque certains échantillons d'euglobulines supposées normales ne diminuaient plus l'activité de l'antigène vaccinant, il nous était possible de reprendre l'expérience initiale avec des euglobulines spécifiques. A cette époque, il ne nous restait plus de sérum de cheval 1310, nous avons donc dû utiliser du sérum d'âne 751. Comme il était très riche en anticorps précipitants (750 γ d'azote précipitable par le polyoside dans 2 cm³ contre 55 γ pour le sérum 1310), il suffisait d'un plus petit volume pour se trouver en excès d'anticorps pour la même quantité de P. C. F. : 0,5 cm³ suffisait contre 2,7 cm³ du sérum 1310. A part cette différence dans les proportions, l'expérience fut conduite exactement comme avec les euglobulines 1310 (tableau I). Elle montra (tableau III A, B, C) que cette fois l'élimination des antigènes précipitants ne supprimait pas totalement le pouvoir immunisant du P. C. F. (III B). Par contre, le sérum (protecteur et précipitant) et les pseudoglobulines (protectrices, mais non précipitantes) supprimaient totalement l'activité du P. C. F. (tableau III D, E) et leur action était encore manifeste avec des quantités aussi faibles que 0,08 cm³ (tableau III H).

Ces résultats nous amenèrent à penser que l'activité observée avec les euglobulines pouvait être due à la présence de traces de pseudoglobulines. Il nous fallait donc essayer des euglobulines « lavées ». Néanmoins, l'impossibilité de laver des euglobulines par une grande quantité d'eau distillée acidifiée par CO₂ (dans laquelle elles sont facilement solubles) nous a fait recourir au procédé expérimental suivant :

Préparation ordinaire des euglobulines 751, dissolution dans du sérum normal de cheval. Une partie est gardée (E₁) ; l'autre est de nouveau précipitée, centrifugée, dissoute dans des pseudo-

TABLEAU III. — Action neutralisante du sérum d'âne 751 et de ses fractions sur le P. C. F.

LAPINS	SÉRIE	NATURE DES INJECTIONS	RÉSULTATS
1 2 3 4	A	P. C. F. L ₃ (1 cm ³) + solution physiologique (3) [0,5 cm ³].	V 1) V V V
5 6 7 8	B	P. C. F. L ₃ (1 cm ³) + euglobulines 751 (4) [0,5 cm ³].	V V + [7] (2) + [8]
9 10 11 12	C	P. C. F. L ₃ (1 cm ³) + euglobulines normales (0,5 cm ³).	V V V V
13 14 15 16	D	P. C. F. L ₃ (1 cm ³) + pseudoglobulines 751 (0,5 cm ³).	+ [3] + [3] + [4] + [4]
17 18 19 20	E	P. C. F. L ₃ (1 cm ³) + sérum 751 (0,5 cm ³).	+ [4] + [4] + [4] + [5]
21 22 23 24	II	P. C. F. L ₃ (1 cm ³) + sérum 751 (0,08 cm ³).	V + [3] + [3] + [3]
25 26		Témoins.	+ [3] + [4]

(1) Vivants.
(2) Morts. Le chiffre entre [] indique le nombre de jours de survie.
(3) NaCl 0,85 %.
(4) Volume calculé pour être en excès d'anticorps précipitants.

globulines normales de cheval. Cette seconde solution précipitée une dernière fois, et le précipité dissous finalement dans du sérum normal fournissant la préparation E₃.

Les résultats expérimentaux, rapportés dans le tableau IV, montrent qu'en effet l'activité destructrice de E₁ a complètement disparu de la fraction purifiée E₃.

Enfin, une expérience, effectuée avec des anticorps anti-polyosidiques dits « purs » (Cf. Matériel), montra que la précipitation du P. C. F. par un excès d'anticorps laissait inchangé le

TABLEAU IV. — Action des « lavages » sur l'activité des euglobulines.

LAPINS	SÉRIE	NATURE DES INJECTIONS	RÉSULTATS
1 2 3 4	A	P. C. F. L ₃ (2 cm ³).	V (1) V V V
5 6 7 8	B	P. C. F. L ₃ (2 cm ³) + euglobulines E ₁ [2 cm ³] (3).	V + [2] (2) + [2] + [4]
9 10 11 12	C	P. C. F. L ₃ (2 cm ³) + euglobulines E ₃ (2 cm ³).	V V V V
13 14		Témoins.	+ [2] + [2]

(1) Vivants.
 (2) Morts Le chiffre entre [] indique le nombre de jours de survie.
 (3) Volume calculé pour être en excès d'anticorps précipitants.

pouvoir vaccinant du surnageant, les lapins survivant tous à l'épreuve.

IV. — Pouvoir vaccinant des précipités spécifiques.

La première expérience avec les euglobulines du sérum de cheval nous avait montré que le précipité spécifique était dénuée de toute activité (tableau I D), confirmant ainsi les résultats obtenus avec le liquide d'œdème [6]. Par contre, la même expérience, effectuée soit avec les euglobulines « lavées » E₃, soit avec les anticorps « purs », montre que, dans ces conditions, les précipités spécifiques lavés cinq fois (alors que les eaux de lavage ne contiennent pratiquement plus d'azote dès le troisième lavage) sont très faiblement vaccinaux (tableau V A, B, C). Ceci nous amena à essayer un précipité immunologique, tout à fait étranger aux antigènes charbonneux, préparé au sein d'une solution de P. C. F. fort. M^{me} Kaminska, du service de M. Grabar, nous a très aimablement procuré un sérum anti-ovalbumine de lapin, ainsi que des cristaux d'ovalbumine. L'expérience fut conduite comme il suit :

A 1 cm³ de P. C. F. fort, nous avons ajouté 1,5 cm³ de sérum anti-ovalbumine, puis 1,4 cm³ d'une solution d'ovalbumine [contenant 60 γ d'azote] (6). Le précipité floulait rapidement et était

TABLEAU V. — Vaccination par les précipités spécifiques.

LAPINS	SÉRIE	NATURE DU PRÉCIPITÉ INJECTÉ	RÉSULTATS
1 2 3 + (3)	A	Polyoside charbonneux antipolyoside. Anticorps purs + P. C. F. pauvre L ₃ (dose vaccinante).	V (1) + [2] (2) + [3]
5 6 7 8	B	Polyoside charbonneux antipolyoside. Anticorps purs + P. C. F. riche (25 doses vaccinales).	V V + [3] + [4]
9 10 11 12	C	Polyoside charbonneux antipolyoside. Anglobulines E ₃ + P. C. F. pauvre L ₃ (dose vaccinante).	V V + (3) + [3]
13 14 15 16	D	Ovalbumine antiovalbumine en présence de P. C. F. riche (25 doses vaccinales).	V + [4] + [4] + [4]
17 18		Témoins.	+ [3] + [3]

(1) Vivants.
(2) Morts. Le chiffre entre [] indique le nombre de jours de survie.
(3) Morts avant l'épreuve.

traité comme les précipités spécifiques charbonneux. Un des 4 lapins qui le reçurent survécut à l'épreuve (tableau V D).

V. — *Action d'un sérum de lapin anti-P. C. F.
sur le pouvoir vaccinant du P. C. F.*

Nous avons recherché, de la même façon qu'avec les sérums précédents, l'activité, sur le pouvoir immunisant du P. C. F., du sérum anti-P. C. F. préparé par Gladstone comme il a été dit plus haut (*Cf. Matériel*). Néanmoins, une difficulté se présentait alors : la précipitation due aux protéines de mouton du P. C. F., et aux anticorps antimouton, du sérum anti-P. C. F. Il fallait donc éliminer ces anticorps du sérum avant d'essayer son activité sur le pouvoir vaccinant du P. C. F. Cela fut réalisé au moyen de sérum de mouton ; on opéra de la façon suivante :

1° Expérience préliminaire :

(6) Proportions communiquées par M^{me} Kaminska comme correspondant au point d'équivalence.

A 12 cm³ de sérum anti-P. C. F., on ajoute 3,6 cm³ de sérum de mouton dilué au 1/10 (léger excès d'antigène). La floculation apparaît très vite ; on laisse deux jours à + 2°, on centrifuge et on lave le précipité à la même température, les eaux de lavage sont ajoutées au surnageant, et le tout est injecté à 2 lapins, en sorte qu'ils reçoivent chacun 6 cm³ du sérum anti-P. C. F.

Les 2 lapins meurent après l'épreuve dans le même délai que les témoins, bien que, dans l'essai précédent, 5 cm³ de sérum aient protégé les 2 lapins. Néanmoins, il s'agissait dans cet essai d'une nouvelle saignée, ce qui peut expliquer la différence d'activité, plus vraisemblablement qu'un entraînement des anticorps par le précipité mouton-antimouton (7).

2° Quoi qu'il en soit [et puisque de très petites quantités de sérum d'âne étaient actives (tableau III H)], malgré cette pauvreté en anticorps protecteurs, nous avons poursuivi l'expérience comme il suit :

A 14 cm³ de sérum anti-P. C. F., on ajoute 4,2 cm³ de sérum de mouton dilué au 1/10.

A 14 cm³ d'un sérum antimouton (8), on ajoute 5,6 cm³ de sérum de mouton dilué au 1/10 (léger excès d'antigène). Les deux mélanges sont laissés quarante-huit heures à + 2°, puis les précipités sont centrifugés et lavés deux fois à cette température avec une solution de NaCl à 0,85 p. 100, les eaux de lavage étant chaque fois ajoutées aux surnageants. On obtient ainsi :

29,6 cm³ de sérum antimouton épuisé (anti-A) ;

29,2 cm³ de sérum anti-P. C. F. épuisé (anti-P. C. F.).

2,1 cm³ de chacune de ces solutions correspondent à 1 cm³ du sérum non dilué. On procède alors à l'immunisation des lapins suivant le mode habituel, avec :

2 cm³ de « P. C. F. L₃ » seuls ;

2 cm³ de « P. C. F. L₃ » + 2,1 cm³ anti-A ;

2 cm³ de « P. C. F. L₃ » + 2,1 cm³ anti-P. C. F.

Les résultats rapportés dans le tableau VI montrent que si le sérum « anti-A » laisse intacte l'activité vaccinante du P. C. F., le sérum « anti-P. C. F. » la diminue.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.

Les expériences exposées ci-dessus permettent d'établir un fait certain : l'injection des bacilles charbonneux (avirulents, mais vaccinants) vivants, aux équidés (âne et cheval) confère à leur

(7) Les petites quantités de sérum dont nous disposions ne nous ont pas permis d'essayer le pouvoir protecteur de doses plus grandes que 6 cm³.

(8) Sérum de lapin préparé par injections d'albumines de mouton.

sérum la propriété de détruire (ou d'annuler) l'activité vaccinnante des filtrats de culture (tableaux I et III). Cette propriété est localisée dans les pseudoglobulines (tableau III D). Les résultats positifs obtenus avec les euglobulines (tableaux I C, III B) s'expliquent par la contamination de ces fractions par une faible quantité de pseudoglobulines puissamment actives, puisque des euglobulines reprecipitées perdent totalement leur activité (tableau IV). L'injection répétée et prolongée de P. C. F. fort à des lapins confère à leur sérum la même propriété (tableau VI).

TABLEAU VI. — **Action neutralisante d'un sérum « anti-P. C. F. » sur le P. C. F.**

LAPINS	SÉRIE	NATURE DES INJECTIONS	RÉSULTATS
1 2 3 4	A	P. C. F. L_{10}	V (1) V V V
5 6 7 8			V V V V
9 10 11 12			V V + [3] (2) + [4]
13 14		Témoins.	+ [3] + [4]

(1) Vivants.
(2) Morts. Le chiffre entre [] indique le nombre de jours de survie.

Les pseudoglobulines des sérums antimicrobiens d'équidés et les sérums anti-P. C. F. contiennent donc les anticorps homologues de l'antigène charbonneux vaccinant.

L'expérience montre, d'une part, que l'injection à des animaux de liquide contenant l'antigène vaccinant (P. C. F.) [2], liquide d'œdème [13], fait apparaître dans leur sang des anticorps protecteurs, d'autre part, que les sérums ou les fractions de sérums d'équidés (pseudoglobulines) contenant les anticorps protecteurs, contiennent les anticorps homologues de cet antigène. Il semble, par conséquent, logique de penser que les anticorps protecteurs sont les anticorps homologues de l'antigène vaccinant. Comment donc certains résultats expérimentaux antérieurs ont-ils pu mettre en doute cette assertion qui semble vraie *a priori* ? impossibilité.

d'obtenir un sérum protecteur par injection de P. C. F. faible au lapin, impossibilité de neutraliser le pouvoir protecteur d'un sérum anticharbonneux, soit avec le P. C. F. [1], soit avec certains liquides d'œdème [16].

C'est, pensons-nous, une question de quantité. L'immunisation d'un animal, en effet, ne nécessite que de très petites quantités d'antigène (glucido-lipidique typhique 0,1 γ pour le lapin [7]; anatoxine botulinique 0,06 γ pour la souris [9]; anatoxine diphtérique 1 à 2 γ pour le cobaye [3], etc.); il est donc très probable que les doses de P. C. F. ou de liquide d'œdème utilisées pour l'immunisation des lapins ne contiennent qu'une très faible quantité d'antigène vaccinant [d'où les difficultés auxquelles se heurte tout essai d'isolement (9)]. Par contre, la protection passive des animaux par injection d'immunsérums (test utilisé pour qualifier un sérum anticharbonneux « protecteur ») demande une grande quantité d'anticorps protecteurs. Cela explique pourquoi des préparations d'euglobulines, incapables de protéger les cobayes ou les lapins contre une inoculation charbonneuse expérimentale, et par conséquent dites non protectrices possèdent néanmoins assez d'anticorps protecteurs pour neutraliser l'activité du P. C. F. et du liquide d'œdème [6] (10).

Cette pauvreté en antigène vaccinant des premiers P. C. F. empêcha Gladstone d'obtenir avec eux un sérum de lapin protecteur.

Enfin, cette disproportion entre, d'une part, les quantités d'antigène présentes dans le P. C. F. et les liquides d'œdème et, d'autre part, les quantités d'anticorps contenues dans des sérums efficacement protecteurs (dans les essais de protection passive) expliquent les échecs rencontrés par Gladstone [1] et les Américains [16] lorsqu'ils tentèrent d'épuiser le pouvoir protecteur des sérums soit par le P. C. F. faible, soit par le liquide d'œdème. Ce dernier était, en effet, dilué dans ces expériences, contrairement au liquide d'œdème utilisé par Matsumoto [12], avec lequel cet auteur put effectivement neutraliser l'activité protectrice d'un sérum anticharbonneux.

Puisque l'élimination des antigènes précipités par les euglobulines n'entraîne nullement l'élimination de l'activité vaccinnante, il faut en conclure que celle-ci ne leur est pas liée, contrairement aux conclusions que nous avons tirées [6] des résultats obtenus

(9) Ceux-ci sont actuellement en cours et feront l'objet d'une publication ultérieure.

(10) C'est sans doute aussi à la présence de traces d'anticorps protecteurs dans certains sérums de chevaux supposés « normaux » que l'on doit attribuer leur légère activité sur le P. C. F. (tableaux I B et II).

avec le liquide d'œdème et qui s'expliquent maintenant de la même façon que pour le P. C. F. : contamination des euglobulines par des traces de pseudoglobulines protectrices. Les faits expérimentaux ne justifient donc plus l'hypothèse d'un glucoprotéide vaccinant, que nous avons émise alors avec P. Grabar, et la nature de l'antigène charbonneux vaccinant reste inconnue.

Les quelques résultats de protection, obtenus avec le précipité spécifique polyoside charbonneux-antipolyoside (tableau V A, B, C), ne peuvent être retenus, puisqu'ils restent du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec un précipité ovalbumine-anti-ovalbumine préparé au sein d'une solution de P. C. F. (tableau V D) et peuvent donc s'expliquer par une très légère adsorption de l'antigène vaccinant sur le précipité spécifique.

RÉSUMÉ.

1° Les sérums anticharbonneux protecteurs obtenus par injection (aux animaux donneurs), soit de bactériidies vivantes, soit de filtrats de culture vaccinaux (Plasma Culture Filtrates de Gladstone) neutralisent l'activité vaccinnante de ces filtrats.

2° Cette activité est liée aux pseudoglobulines des sérums des équidés, l'activité observée avec les euglobulines n'étant due qu'à leur contamination par de petites quantités de pseudoglobulines.

3° Il semble raisonnable d'attribuer cette propriété aux anticorps protecteurs, même lorsqu'ils sont en trop faible quantité pour être détectés par un essai de protection passive.

4° Certains sérums de chevaux supposés normaux possèdent à un très faible degré la même propriété que les sérums anticharbonneux, probablement par suite de la présence de quelques anticorps anticharbonneux protecteurs (dits « naturels »).

5° Les premiers résultats obtenus avec le « Plasma Culture Filtrate » furent identiques à ceux publiés au sujet du liquide d'œdème, mais une étude plus approfondie, rendue possible cette fois par l'obtention *in vitro* de ce nouveau matériel vaccinant, aboutit à des résultats différents qui complètent les premiers, mais ne nous permettent plus d'en tirer les mêmes conclusions. Les antigènes précipitants ne sont pas responsables de la vaccination et l'hypothèse, émise alors, d'un glucoprotéide vaccinant, ne peut plus être soutenue.

★ ★

Ce travail a été effectué au « Lister Institute » de Londres, dans le service de Sir P. Fildes, en collaboration étroite avec le Dr G. P. Gladstone. Je ne saurais assez remercier le premier pour son accueil bienveillant et le second pour sa précieuse collaboration, tant matérielle qu'intellectuelle pendant ces vingt-deux

mois. C'est à lui que je dois, en effet, en dehors de précieux échanges de vues, la préparation bactériologique de tous les P. C. F. étudiés, ainsi que la plus grande partie des injections aux animaux.

Mes remerciements vont aussi au Medical Research Council, qui a pris totalement en charge les frais de ce travail : bourse personnelle et dépenses de laboratoire.

Ma reconnaissance est due enfin à tout le personnel scientifique et technique du service (particulièrement le personnel attaché aux animaux) pour leurs suggestions et leur aide au cours de ces expériences.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GLADSTONE (G. P.). *Brit. J. exp. Path.*, 1946, **27**, 394.
- [2] GLADSTONE (G. P.). *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 379.
- [3] GLENNY (A. T.) et WADDINGTON (H.). *J. Path. Bact.*, 1928, **31**, 403.
- [4] GRABAR (P.) et STAUB (A. M.). *Ces Annales*, 1942, **68**, 355.
- [5] GRABAR (P.) et STAUB (A. M.). *Ces Annales*, 1944, **70**, 129.
- [6] GRABAR (P.) et STAUB (A. M.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 534.
- [7] GRABAR (P.) et OUDIN (J.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 627.
- [8] HEIDELBERGER (M.) et KENDALL (F. E.). *J. exp. Med.*, 1936, **64**, 161.
- [9] HOHLE (G. A.) et ABRAMS (A.). *J. Immunol.*, 1947, **55**, 183.
- [10] IVANOVICS (G.). *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1940, **97**, 402.
- [11] KLECZKOWSKI (A.). *Brit. J. exp. Path.*, 1945, **26**, 41.
- [12] MATSUMOTO (T.). *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1924, **40**, 402.
- [13] SALSBERY (C. E.). *J. Am. vet. med. Ass.*, 1925-1926, **68**, 755.
- [14] STAUB (A.). Communication personnelle inédite.
- [15] STAUB (A.), LAMY (R.) et VIRAT (B.). *C. R. Acad. vétér.*, 1947, **20**, 428.
- [16] WATSON (D. W.) et coll. *J. inf. Dis.*, 1947, **80**, 28.

TECHNIQUE D'IDENTIFICATION RAPIDE DES ENTÉROBACTÉRIACÉES

par FREDY ROLAND et DANIELLE BOURBON (*).

(Service de Microbie. générale de l'Institut Pasteur.)

En France, les coprocultures systématiques ne sont pas entrées dans la pratique. Dans les diarrhées de l'enfant et du nourrisson, dans les épidémies de dysenterie ou de typhoïde, au cours des intoxications alimentaires, elles constituent cependant le seul moyen de déceler le microbe cause de la maladie. Pour être à la portée des laboratoires d'analyse l'identification des germes doit être d'une technique simple, et pour être utile elle doit permettre une réponse en quarante-huit heures ; aussi sommes-nous d'accord avec Jude [1] sur l'intérêt des « Milieux combinés ». Russel [2] en 1911 formulait pour la première fois un milieu donnant deux réponses ; récemment nous-mêmes [3, 4, 5], Brisou [6] et Jude [1] avons insisté sur l'utilité de ces milieux maintenant nombreux.

INTÉRÊT DES MILIEUX DIFFÉRENTIELS « MILIEUX COMBINÉS ».

Les milieux d'isolement sélectifs, employés pour les Entérobactériacées : milieu de Kauffmann (Le Minor) [7], gélose S.S., (Roland) [4, 8] indiquent seulement si les colonies développées font ou non *fermenter le lactose en vingt-quatre heures sur milieu solide*. La réduction du matériel et la simplification des manipulations permettent de reprendre sur chaque plaque de gélose sélective non pas une seule colonie, mais plusieurs. En effet, sur une plaque de gélose, on peut avoir des colonies pathogènes appartenant à des espèces différentes et aussi des colonies de germes considérés comme non pathogènes, ne faisant pas fermenter le lactose (*Fecalis alcaligenes*, *Proteus*), ou le faisant fermenter tardivement en quarante-huit heures ou plus (*Proshigella*, *Paracôlons*). La mise en évidence des caractères biochimiques importants permet en même temps le choix des sérums à utiliser pour les tests d'agglutination sur lame. On pourra

*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 février 1949.

alors donner une réponse présomptive rapide qui oriente le clinicien, et l'identification du germe sera poursuivie dans un laboratoire spécialisé.

LES MILIEUX COMBINÉS A EMPLOYER.

Pour Jude [2], « on utilisera avec avantage des milieux différentiels donnant le maximum de réponse avec le minimum de manipulations ». Nous préférons des réponses moins nombreuses, mais nous apportant une indication précise de genre ou d'espèce. Nous donnons, dans le tableau I, une discrimination des genres simplifiée à l'extrême. Les dénominations que nous employons sont empruntées à Borman, Stuart et Wheeler [9].

TABLEAU I. — **Entérobactériacées.**

Lactose . .	{	1° +	Urée +	<i>Colobactrum.</i>
		2° -	Urée -	<i>Proteus.</i>
			{ Mobiles	<i>Salmonella.</i>
			{ Immobiles	<i>Shigella.</i>
		3° + lentement	{ Glucose + gaz	<i>Paracolobactrum.</i>
			{ Glucose + sans gaz	<i>Proshigella.</i>

La fermentation du lactose divise les Entérobactériacées non chromogènes en trois groupes.

Parmi les groupes 2 et 3 la discrimination entre bacilles pathogènes et bacilles non pathogènes doit être faite rapidement. L'étude de la production d'uréase permet d'éliminer les espèces non pathogènes : les bacilles du genre *Proteus* et certains Paracôlons décomposent l'urée en milieu tamponné. Les bacilles qui ne produisent pas d'uréase en milieu tamponné, à part quelques Paracôlons, sont des germes pathogènes appartenant aux genres *Salmonella*, *Shigella* ou *Proshigella*, distingués facilement les uns des autres par l'étude de la fermentation du glucose (avec ou sans gaz) et celle de la mobilité. Il faut donc grouper les réactions donnant ces réponses dans le moins de milieux possible. Littmann [10], un des premiers, a étudié les méthodes les plus rationnelles pour l'identification des Entérobactériacées.

Jude dans un article récent [2] emploie :

Un milieu à deux sucres (lactose-glucose) et indicateur d' H_2S , modification apportée par nous [3] au milieu à trois sucres de Hajna [11].

Un milieu de mobilité [12], qui lui sert en même temps de milieu de recherche pour l'indol.

Un milieu à deux sucres (mannite-saccharose) [13] intéressant pour la différenciation des espèces du genre *Shigella* et *Proshigella*.

Un milieu de recherches de production d'uréase (Fergusson et

Hook) [14], qui lui sert une fois donnés les résultats des autres milieux différentiels et pratiquement pour différencier les paratyphiques B des *Proteus*.

Nous-mêmes avons employé :

Un milieu à deux sucres et indicateur d'H₂S ;

Un milieu de mobilité ;

Un milieu d'étude de l'uréase.

On voit que Jude, à notre méthode d'identification [3, 4] ajoute le milieu à deux sucres de Kendall et Ryan [13]. A notre avis, si l'étude de la mannite est essentielle pour le genre *Shigella*, l'étude de la fermentation du saccharose est à rejeter

TABLEAU II.

	1		2		3		
	Urée	Indol	Mobilité	Mannite	Glucose	Lactose	H ₂ S
<i>Atc. fecalis</i>	— (+)	—	+ —	—	—	—	—
<i>Sh. dysenteriae</i>			—	—	+	—	—
<i>Sh. p. dysenteriae</i> Newcastle			—	—	+ g	—	—
<i>Sh. paradysenteriae flexneri</i>			—	+	+	—	—
<i>Sh. sonnei</i>			—	+	+	+ L	—
<i>Sal. gallinarum</i>			—	+	+	—	+
<i>Sal. pullorum</i>		—	—	+	+ g	—	+
<i>Sal. typhi</i>			+	+	+ g	—	+
<i>Sal. paratyphi A</i>			+	+	+ g	—	+
<i>Sal. paratyphi B</i>			+	+	+ g	—	+
<i>Aerobacter aerogenes</i>			— +	+	+ g	+	—
<i>Aerobacter cloacæ</i>			— +	+	+ g	+	—
<i>Paracolon aerobacter</i>			+ —	+	+ g	+ L	— (+)
<i>Sh. ambigua</i>			—	—	+	—	—
<i>Paracolon annerogenes</i>			— +	— +	+	— (+ L)	—
<i>Sh. paradysenteriae</i> Manchester			—	+	+ g	—	—
<i>Sh. paratyphicæ flexneri</i>			—	+	+	—	—
<i>Sh. alkalescens</i>			—	+	+	—	—
<i>Sh. dispar</i>	—	+	—	+	+	+ L	—
<i>Escherichia coli</i>			+ —	+	+ g	+	—
<i>Escherichia intermédiaire</i>			+ —	+	+ g	+	—
<i>Paracolon escherichia</i>			+ —	+	+ g	+ L	—
<i>Paracolon intermédiaire</i>			+ —	+	+ g	+ L	—
<i>Paracolon aerobacter</i>	+ L	—	+ —	+	+ g	+ L	—
<i>Paracolon escherichia</i>	+ L	+	+ —	+	+ g	+ L	—
<i>Proteus mirabilis</i>	+	—	+	—	+ g	—	—
<i>Proteus morgani</i>			+	—	+ g	—	—
<i>Proteus rettgeri</i>	+	+	+	+	+ g	—	—
<i>Proteus vulgaris</i>			+	—	+ g	—	—

—, urée non utilisée indol non produit, immobile, glucides non fermentés; +, urée utilisée, production d'indol, mobile, glucides utilisés; L, lentement; g, gaz

pour une identification rapide ; c'est justement le sucre que nous avons supprimé du milieu de Hajna. Le saccharose est ajouté pour éliminer des *Paracôlons* et les *Proteus* ; mais certaines espèces de ces deux genres ne fermentent pas le saccharose (Neter) [45], d'autre part, *Shigella alkalescens*, lorsqu'elle est fraîchement isolée, peut faire fermenter le saccharose. On peut étudier la fermentation de la mannite dans le milieu de mobilité, en y ajoutant ce sucre et un indicateur de réaction. La mannite est un sucre important pour l'étude des *Shigella* et des *Proshigella*, bacilles qui font fermenter les sucres *sans gaz* ; l'interprétation de la mobilité ne sera donc pas gênée par l'adjonction de ce sucre.

Avec M^{me} Szturm [5] nous avons mis au point un milieu qui permet d'étudier la production d'uréase et d'indol par les colonies isolées sur les milieux sélectifs ; au bout de quatre à cinq heures, l'urée est décomposée ou non et, dans ce deuxième cas, la culture obtenue nous sert à ensemencer les autres milieux combinés :

Milieu à deux sucres (lactose-glucose) et indicateur d'H₂S.

Milieu mobilité mannite (2/00).

Ces trois milieux nous permettent d'identifier les genres et même les espèces des Entérobactériacées. En groupant les réponses nous établissons 29 schémas différents (tableau II). Chaque schéma correspond à une espèce, mais une espèce peut avoir plusieurs schémas.

CONCLUSION.

Nous avons essayé de montrer les avantages des milieux différents, de discuter des meilleurs d'entre eux. L'utilisation du milieu urée-tryptophane pour repiquer les colonies isolées sur milieu sélectif sert de base à notre technique en éliminant très rapidement les germes non pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JUDE (A. L.). *Revue Corps Santé Mil.*, 1947, **3**, 236.
- [2] RUSSEL (F. F.) et WASHINGTON (D. C.). *J. med. Res.*, 1911, **25**, 217.
- [3] ROLAND (F.). *Bull. Méd.*, 1946, **60**, 397.
- [4] ROLAND (F.). *Thèse Doctorat en Médecine*, Paris, 1946.
- [5] ROLAND (F.), BOURDON (D.) et SZTURM (S.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 914.
- [6] BRISOU (J.). *Entérobactéries pathogènes*, Paris, 1946, Masson, édité.
- [7] LE MINOR (L.). *Thèse Doctorat en Médecine*, Paris, 1945.
- [8] ROLAND (F.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 68.
- [9] BORMAN (E. K.), STUART (C. A.) et WHEELER (K. M.). *J. Bact.*, 1944, **48**, 351.

- [10] LITTMAN (M. L.). *War Med.*, 1943, **4**, 31.
- [11] HAJNA (A.). *J. Bact.*, 1945, **49**, 516.
- [12] TITTSLER (R. P.) et SANDHOLZER (L. A.). *J. Bact.*, 1936, **31**, 575.
- [13] KENDALL et RYAN. *J. inf. Dis.*, 1919, **24**, 400.
- [14] FERGUSSON (W. J.) et HOOK (A. E.). *J. lab. clin. Med.*, 1943, **28**, 1715.
- [15] NETER (E.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 609.

ACTION DE L'ACRIFLAVINE SUR LES LEVURES

I. — LA MUTATION « PETITE COLONIE »

par BORIS EPHRUSSI, HÉLÈNE HOTTINGUER et ANNE-MARIE CHIMENES.

(Institut de Génétique du C. N. R. S.
et Institut de Biologie physico-chimique, Paris.)

INTRODUCTION.

La littérature biologique contient des données nombreuses sur les variations héréditaires induites chez les Levures. Des mutations auraient été provoquées par le froid, la chaleur, des produits chimiques variés et par les radiations. La plupart, sinon l'ensemble de ces résultats, sont cependant sujets à critique et laissent entiers, d'un côté, le problème du *mode d'origine des variations* observées (qui peuvent être attribuées aussi bien à une sélection, en présence de l'agent expérimental, de mutants spontanés, qu'à l'induction de mutations par cet agent) et, de l'autre, celui de la *nature des variations*, décrites sous les noms plus ou moins définis de « mutants », « variants » ou encore de « saltants ».

Les recherches récentes de Winge (1935) et Winge et Laustsen (1937), ont montré la possibilité d'isoler et de croiser des lignées haploïdes de levures. Elles mettent ainsi à la disposition du chercheur un matériel favorable à la détection des mutations et lui fournissent la possibilité d'appliquer aux levures la technique classique de localisation et d'analyse du patrimoine héréditaire : le croisement. D'un autre côté, la littérature microbiologique s'est enrichie, au cours des dernières années, de toute une série de travaux théoriques qui ont mis en relief les difficultés inhérentes aux travaux sur les mutations des micro-organismes et formulé un certain nombre de desiderata que doit satisfaire l'expérimentation pour conduire à une démonstration rigoureuse de l'induction de mutations (*Cf* les revues de Luria, 1947 et Lederberg, 1948).

Ce sont ces faits qui nous ont incités à reprendre sur les levures le problème de l'induction expérimentale des mutations, par voie chimique en particulier. Parmi les corps dont l'action nous parut intéressante à examiner, nous avons choisi tout d'abord les acridines, parce que leur pouvoir bactéricide bien connu semble être dû à leur capacité de combinaison avec les nucléotides (McIlwain,

1942). Or, tout semble indiquer à l'heure actuelle que les acides nucléiques font partie intégrante du substratum héréditaire des organismes. Il nous a donc paru possible que la culture des levures en présence d'acridines, puisse conduire, par l'intermédiaire de la déviation expérimentale du métabolisme des acides nucléiques, à des changements de la constitution de leur substratum héréditaire, c'est-à-dire à des mutations.

L'action de l'acriflavine conduit effectivement à une transformation héréditaire des levures. Cette transformation paraît intéressante à plus d'un point de vue et son étude génétique, physiologique et biochimique est actuellement poursuivie par plusieurs chercheurs. L'ensemble de ces travaux, sur lesquels une mise au point a récemment été publiée par l'un de nous (Ephrussi, 1949), paraîtra sous le titre général ci-dessus.

Le présent travail, premier de la série, est consacré principalement à la description de la transformation que l'on observe sous l'action de l'acriflavine et à la démonstration de sa nature idiosyncratique. Les faits rapportés poseront, à propos de la transformation décrite, les deux problèmes mentionnés plus haut : celui de son mécanisme et celui de la nature génétique des produits de la transformation. Le dernier de ces problèmes sera abordé dans le II^e mémoire qui relatara les résultats de l'étude génétique des levures transformées. L'étude du mécanisme de la transformation sera abordée dans le présent mémoire, mais le début d'analyse qui sera donné fera apparaître la nécessité d'une étude beaucoup plus fine. Une étude quantitative de la transformation fera l'objet du mémoire VI qui comportera une discussion générale, s'appuyant sur l'ensemble des faits présentés, et du mécanisme de la transformation et de sa nature génétique. Trois autres publications (III, IV, V), dès maintenant prévues, donneront les résultats des études physiologiques et biochimiques comparées des levures normales et mutantes.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Souches. — Dans le travail que l'on va lire, les souches suivantes de levures ont principalement été utilisées :

Souches diploïdes. — *Saccharomyces cerevisiae* « Boulangerie II », provenant de la collection du Laboratoire des Fermentations de l'Institut Pasteur de Paris ;

S. ellipsoides « Pouilly II », de même origine.

Souches haploïdes. — 59 R : lignée haploïde constituée à partir d'une ascospore de « Boulangerie II », isolée à l'aide du micro-manipulateur de Fonbrune.

59 Rp et 59 RA, souches mutantes apparues, la première spontanément, la deuxième à la faveur d'un traitement par l'acrifla-

vine, dans des cultures de 59 R. (Leur histoire plus exacte est décrite p. 355.) Quelques expériences ont été réalisées sur *S. carlsbergensis* (Mrak) qui nous a été envoyée par le Dr Spiegelman, de l'Université Saint-Louis (U. S. A.), et sur les souches suivantes qui nous ont été données par le professeur O. Winge, de Copenhague :

S. cerevisiæ « Yeast Foam » (levure de boulangerie américaine).

S. mandshuricus Saito,

S. italicus Castelli,

S. validus Hansen.

Milieu. — En dehors des expériences, nos souches ont été maintenues à la température du laboratoire et sur le milieu dont la composition est donnée ci-dessous :

Milieu aux touraillons gélosé :

Agar	0,2 g.
Glucose	30 g.
Phosphate d'ammonium	2 g.
Sulfate de magnésium	0,2 g.
Eau de touraillons (1)	Q. S. 1.000 cm ³

Ce même milieu a été généralement employé dans les expériences où un milieu solide était requis. Les cultures en milieu liquide étaient faites dans un milieu qui ne différait du précédent que par l'absence de l'agar. Le pH de ce milieu est 5,8-5,9.

A de rares exceptions près, qui seront mentionnées dans le texte, les expériences ont été conduites à 25° C.

L'Acriflavine utilisée dans nos expériences est la préparation commerciale fournie par la maison « British Drug House » : c'est un mélange (dans la proportion 2:1, approximativement) des chlorhydrates du chlorure de 2 : 8-diamino-10-méthylacridinium et de la 2 : 8-diaminoacridine. Nous nous servons d'habitude d'une solution mère aqueuse à 1 p. 1.000 gardée à l'obscurité et à la glacière et qui, selon les besoins, est diluée dans les milieux de culture. Aux concentrations employées dans la majorité de nos expériences, l'acriflavine n'affecte pratiquement pas le pH de notre milieu.

Pour l'estimation de la croissance des cultures, les techniques suivantes ont été employées au cours de ce travail :

a) La croissance des colonies sur milieu solide (en boîtes de Petri) était suivie par la mesure des diamètres des ombres des colonies projetées sur un écran sous un grossissement de $\times 2$. L'emploi de ce procédé, que nous savons très approximatif, se justifie par le fait que les colonies des levures ainsi mesurées sont circulaires.

(1) L'eau de touraillons est préparée en faisant bouillir, pendant vingt minutes, 30 g. de touraillons dans 1 litre d'eau. L'extrait ainsi obtenu est filtré avant d'être additionné des sels, du glucose et de l'agar.

plates et d'épaisseur peu variable, et surtout par l'usage très limité qui a été fait des chiffres ainsi obtenus. La taille des colonies dépend à la fois du génotype de la souche et du milieu : en particulier, pour une souche donnée et un milieu défini, la taille des colonies est fonction de leur densité. Dans les expériences dont il sera question, les comparaisons n'ont été faites qu'entre boîtes de Petri comportant des nombres sensiblement égaux de colonies : 20 à 30 colonies par boîte contenant 30 cm³ de milieu.

b) Pour le dénombrement des effectifs des cultures en milieu liquide, nous avons eu recours soit aux numérations à l'hématimètre, soit aux étalements sur milieu gélosé en boîtes de Petri.

L'emploi de cette dernière technique appelle une remarque fort importante. L'étalement sur agar est une technique classique en microbiologie, mais dont l'usage ne se justifie réellement que lorsqu'une seule cellule se trouve à l'origine de chaque colonie. Chez les levures, qui se reproduisent par bourgeonnement, cela n'est manifestement pas le cas. Il résulte du mode particulier de leur multiplication que les cultures en prolifération active sont constituées par des groupes ou « paquets » de cellules, dont l'importance dépend en particulier de la phase de croissance de la culture et de la nature génétique de la souche. D'une manière générale, on ne trouve de populations de cellules isolées que dans de très vieilles cultures. Pendant la phase exponentielle de la croissance, le nombre de cellules par « paquet » n'excède d'habitude pas 2 à 3 dans les souches diploïdes ; dans les cultures haploïdes, au contraire, les groupes sont généralement beaucoup plus importants. Une des raisons du choix de la souche 59 *H* employée dans ce travail a été précisément le fait que les « paquets » qu'elle forme sont moins importants que dans beaucoup d'autres souches haploïdes : pendant la phase de croissance la plus active, la population est composée surtout de paquets de 2 cellules, quoique des groupes de 3 et 4 soient fréquents aussi. On verra que ces faits introduisent des incertitudes qui nous préoccuperont plus d'une fois.

LE PHÉNOMÈNE ÉTUDIÉ.

Le phénomène qui constitue le point de départ du présent travail, a été observé dès notre première expérience et se retrouve avec une constance parfaite chaque fois que les conditions expérimentales sont reconstituées. C'est pourquoi nous commencerons par donner un compte rendu détaillé d'une expérience type :

Trois tubes à essai contenant, l'un, 5 cm³ de milieu normal (tube T), les deux autres 5 cm³ de milieu acriflaviné à 1 p. 100.000 (tube A-1) et à 1 p. 10.000 (tube A-2), sontensemencés avec une

goutte d'une culture de quarante-huit heures de la souche 59 R et placés à l'étuve à 25°.

Quarante-huit heures plus tard, ces trois cultures sont diluées de façon à contenir une vingtaine de groupes cellulaires par goutte. Plusieurs échantillons (II gouttes) de chacune sont étalés sur milieu gélosé en boîtes de Petri et placés à 25°.

Des examens quotidiens de ces boîtes à l'œil nu montrent que les colonies de la culture témoin (tube T) apparaissent quarante-huit heures après l'étalement. Soixante-douze heures après celui-ci elles mesurent environ 3 mm. de diamètre et à ce moment apparaît en outre un très petit nombre (1 p. 100 environ) de nouvelles

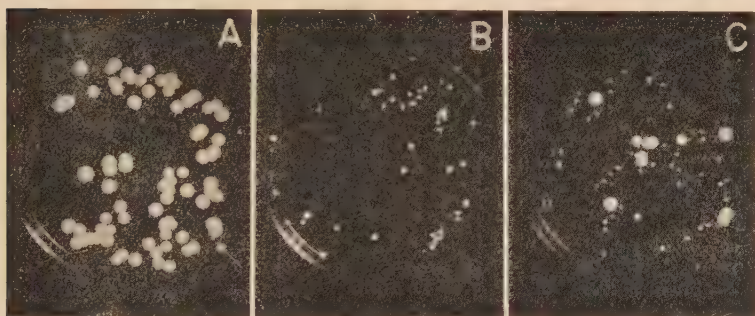


FIG. 1. — A, colonies de la souche 59R âgées de cinq jours; B et C, colonies âgées de cinq jours, formées par la souche 59R ayant proliféré quarante-huit heures en milieu acriflaviné à 1 p. 10.000 et 1 p. 100.000, respectivement. $\times 0,31$.

colonies. Enfin, six jours après l'étalement, la culture présente l'aspect reproduit dans la photographie de la figure 1 A qui permet de constater la grande uniformité de taille (environ 6,5 mm. de diamètre) et de forme des colonies et la présence d'une petite colonie, apparue un jour plus tard et appartenant à un ordre de grandeur nettement différent.

Dans les boîtes A-2, aucun développement de colonies n'est visible à l'œil nu après quarante-huit heures. Celles-ci apparaissent trois jours après l'étalement de la culture, et six jours plus tard elles sont toutes de la taille des rares petites colonies de la culture témoin (fig. 1 B) :

Enfin, dans chacune des boîtes A-1, quelques colonies font également leur apparition quarante-huit heures après l'étalement, mais un nombre plus grand n'apparaît que soixante-douze heures plus tard. Six jours après le commencement de l'expérience, on constate (fig. 1 C), que les premières sont sensiblement de la taille

des grandes colonies du témoin, alors que la taille des colonies apparues le lendemain est voisine de celle des colonies de la culture A-2 (environ 2,5 mm. de diamètre).

La différence de taille entre petites et grandes colonies est particulièrement frappante dans les boîtes A-1, où les colonies des deux types se développent les unes à côté des autres. Les mesures des diamètres des colonies au sixième jour, dont les résultats sont donnés par la figure 2, montrent que les colonies appartiennent à deux classes distinctes ; les diamètres, sujets à quelques variations,

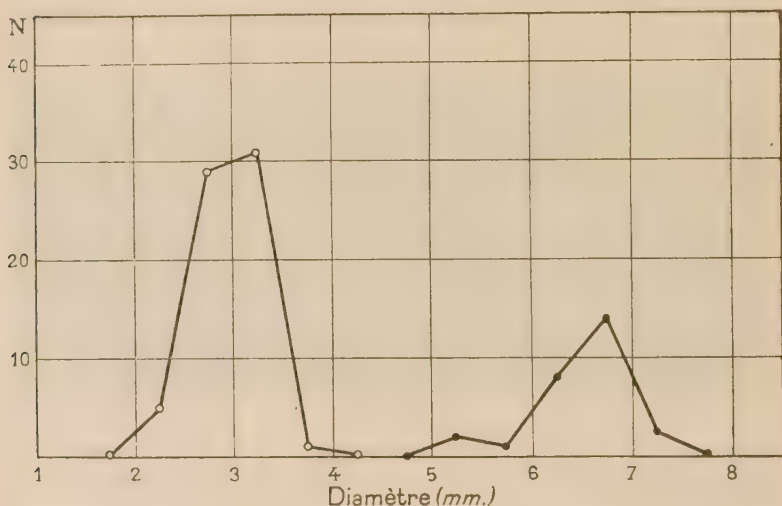


FIG. 2. — Courbes de variation des tailles des colonies de la levure acriflavine. Points, grandes; cercles, petites; ordonnée, fréquence; abscisse, diamètre des colonies

se groupent sans chevauchement autour de deux moyennes nettement différentes [6,5 mm. et 3 mm. au sixième jour] (2). Cette différence de taille des colonies persiste jusqu'à la fin de la croissance qui s'arrête, dans les conditions de l'expérience, au bout de quinze à vingt jours. Ajoutons que les cellules qui composent les petites colonies sont légèrement plus petites que celles qui constituent les grandes. Mais leurs dimensions moyennes (1,5 à 5,5 μ et 6 à 7 μ , selon l'expérience) sont cependant plus rapprochées que celles des colonies elles-mêmes.

Des résultats semblables ont été obtenus avec plusieurs autres

2) Il faut noter en outre que quelques-unes des grandes colonies présentent des contours irréguliers qui nous les ont fait appeler « colonies festonnées. » Nous les retrouverons plus loin (voir p. 361).

souches haploïdes, issues d'ascospores isolées d'asques de *Boulangerie II* et de *Yeast Foam*.

Le traitement par l'acriflavine d'une population de cellules de levure conduit donc rapidement à une transformation de celle-ci. Si la concentration d'acriflavine est suffisamment élevée, la transformation porte sur la population entière qui est alors composée uniquement de cellules plus petites, qui prolifèrent plus lentement et forment des colonies de taille finale réduite. Seule la proportion de cellules de ce type est fonction de la concentration d'acriflavine. La taille des colonies en est au contraire indépendante : aucun terme de passage n'est en effet observé entre les grandes colonies du témoin et les petites de la culture acriflavinée.

Cette discontinuité suggère immédiatement que les petites colonies représentent une variation idiotypique plutôt qu'une modification transitoire, c'est-à-dire phénotypique, sous l'influence de l'acriflavine. Ceci se trouve effectivement confirmé par l'étude de la descendance végétative des petites colonies.

PERMANENCE DU CARACTÈRE « PETITE COLONIE ».

Afin de voir si la différence de taille entre les petites et les grandes colonies persiste au cours des générations cellulaires successives, plusieurs expériences ont été réalisées, dans lesquelles les tailles coloniales ont été mesurées après des nombres croissants de passages en milieu liquide.

Dans une expérience, par exemple, trois colonies ont été prélevées etensemencées en milieu liquide : l'une était une grande colonie d'une culture-témoin (souche 59 R), l'autre 59 Rp) une « petite » trouvée dans la même culture, la troisième (59 RA) une des nombreuses petites colonies qui se sont développées à la suite d'un traitement de vingt-quatre heures par l'acriflavine à 1 p. 50.000 de la souche 59 R. Ces cultures, qui sont à l'origine des souches de même nom mentionnées p. 352, ont été ensuite repiquées toutes les vingt-quatre heures par ensemencement de nouveaux tubes de 5 cm³, avec une anse de culot de la culture. Dans ces conditions, et à 25°, il se produit environ six générations cellulaires en vingt-quatre heures. De temps en temps, des échantillons des trois cultures étaient étalés sur milieu gélosé selon la technique précédemment décrite et leur croissance suivie de jour en jour par la mesure des diamètres de 20 à 30 colonies.

Une partie des résultats de cette expérience est donnée par la figure 3 qui montre tout d'abord une légère diminution de l'écart entre les courbes de croissance des grandes et des petites colonies entre le 3^e et le 53^e passage, diminution qui est due à la réduction du retard de l'apparition des dernières et que l'on observe toujours entre le 1^{er} et le 20^e passage. Les mesures effectuées au cours

des repiquages ultérieurs montrent la persistance des différences entre les tailles finales des grandes et petites colonies (quelle que soit l'origine des dernières). Une légère diminution de cet écart est à noter, mais nous allons voir plus tard qu'elle n'est pas indicative d'un retour progressif à la forme normale, car elle n'est pas

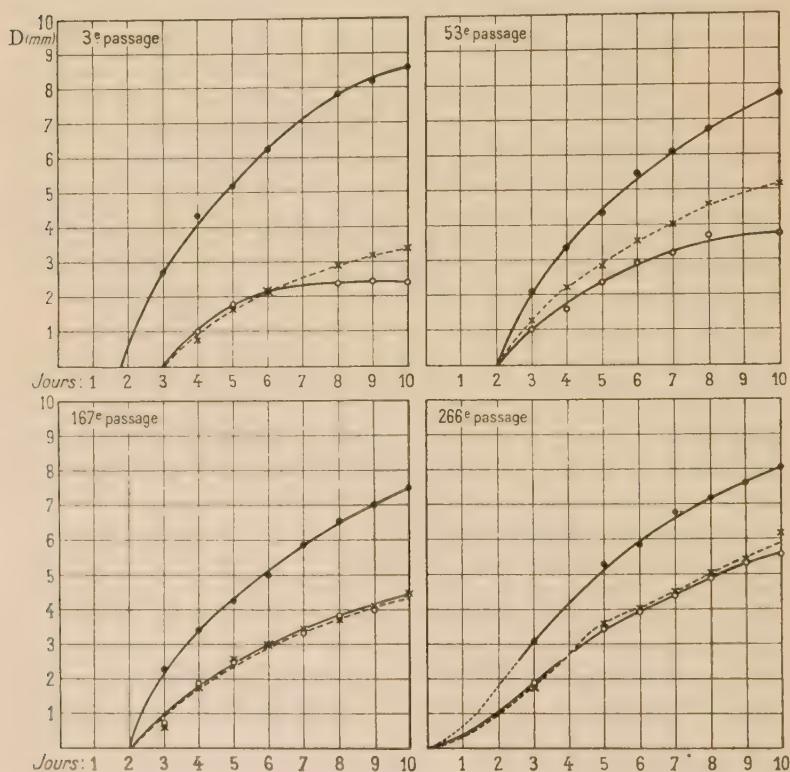


Fig. 3. — Courbes de croissance des colonies des souches 59R (points), 59RA (cercles) et 59Rp (croix) après 3, 53, 167 et 266 passages en milieu liquide normal; ordonnée, diamètre moyen des colonies en millimètres; abscisse, temps.

accompagnée du rétablissement des caractéristiques biochimiques fondamentales (voir mémoire V). Nous pouvons donc conclure que le caractère « petite colonie » s'est maintenu au cours de 266 passages, c'est-à-dire après plus de 1.600 générations cellulaires.

L'expérience particulière qui vient d'être décrite a été choisie parce qu'elle comporte le nombre le plus élevé de passages que nous avons fait subir aux levures acriflavées. D'autres, moins prolongées, ont donné des résultats semblables (un autre exemple

en sera donné p. 363). Notre exposé serait cependant incomplet si nous ne signalions pas à cet endroit des cas différents. En effet, si on prélève un grand nombre de petites colonies qui viennent de se former à la suite d'un traitement par l'acriflavine, si on les suspend dans du milieu liquide et si on réétale dans des boîtes de Petri des échantillons de ces cultures, soit immédiatement, soit après quelques passages, on constate qu'à côté des lignées qui ne forment que des petites colonies, il en existe d'autres, beaucoup moins nombreuses, semble-t-il, qui forment un mélange de petites et de grandes colonies. Bien plus : le réétalement des petites colonies provenant d'un tel mélange, conduit souvent à son tour au développement d'un mélange de colonies des deux types.

Dans certains cas par conséquent, les petites colonies représentent un type cellulaire parfaitement stable que nous sommes en droit de considérer comme le produit d'une mutation. L'irréversibilité de celle-ci, suggérée dans ces cas par le maintien du caractère mutant au cours de très nombreux passages, appelle cependant quelques réserves qui seront formulées dans la Discussion. Nous y discuterons également la signification des « réversions ».

MÉCANISME DE LA TRANSFORMATION.

Quel est le mode d'origine des mutants qui forment les petites colonies et qui remplacent, à la faveur du traitement par l'acriflavine, les levures normales ? L'allure du phénomène, en particulier sa rapidité et son caractère massif, suggèrent qu'il s'agit de l'induction d'une mutation par l'acriflavine. Mais la présence, dans les cultures normales, d'un petit nombre de colonies phénotypiquement semblables (3) à celles qui, en présence d'acriflavine, se développent en grand nombre (ou uniquement), oblige à se demander si l'action de cet agent n'est pas purement sélective. En d'autres termes, l'action de l'acriflavine est-elle réellement mutagène ou se limite-t-elle à la sélection d'un mutant spontané, moins sensible que la forme normale à son action toxique ? Le fait même que l'action de l'acriflavine se traduit par le remplacement d'une forme par l'autre, s'oppose à la détermination directe de leurs sensibilités relatives. En l'absence d'une preuve directe contraire, nous sommes donc contraints d'envisager la possibilité

(3) Au moment où les expériences qui seront relatées ci-dessous ont été entreprises, la petite taille finale des colonies était la seule caractéristique connue de ces mutants. Les travaux ultérieurs (voir mémoires III, IV, V) ont permis de relier ces caractéristiques de croissance à des déficiences physiologiques précises qui différencient les mutants de la forme normale. D'un autre côté, rien ne permet jusqu'ici de différencier les mutants spontanés de ceux qui apparaissent, en grand nombre, en présence d'acriflavine.

que les phénomènes observés s'expliquent par une plus grande sensibilité à l'action de l'acriflavine de la forme normale et d'un avantage sélectif de la forme mutante en présence de ce corps ; et nous devons reconnaître que les expériences décrites au début de ce travail offrent des conditions excellentes pour une sélection de cette sorte. Il est en effet concevable que, dans les expériences de ce type, l'action de l'acriflavine consiste simplement dans l'élimination rapide et sélective des cellules qui, normalement, sont à l'origine des grandes colonies, et que seules continuent à se multiplier les cellules mutantes, présentes dans la population inoculée. Cette forme la plus simple de l'hypothèse de sélection — *hypothèse de sélection des mutants préexistants*, — peut être mise à l'épreuve en arrangeant l'expérience de façon à pouvoir tracer l'origine des colonies aux diverses cellules inoculées dans le milieu acriflaviné. Cette condition peut être réalisée en étalant des échantillons égaux d'une culture soit sur du milieu gélosé normal, soit sur du milieu gélosé acriflaviné. Chaque colonie étant formée par les descendants directs d'une cellule (ou d'un petit groupe cellulaire) de la population étalée, on peut ainsi vérifier une conséquence numérique de l'hypothèse formulée : si toutes les petites colonies formées en milieu acriflaviné dérivent des mutants préexistants, leur nombre doit être égal au nombre de mutants spontanés trouvés dans le témoin et, par conséquent, inférieur au nombre total de colonies formées par celui-ci.

Plusieurs expériences de ce type ont été réalisées en étalant des volumes égaux d'une culture de vingt-quatre heures de la souche 59 R dans chacune d'une série de boîtes de Petri contenant soit 30 cm³ de milieu gélosé normal, soit 30 cm³ du même milieu additionné d'acriflavine à des concentrations variées. Après quelques jours de croissance à 25°, les colonies étaient dénombrées.

L'examen des chiffres des trois premières colonnes du tableau I qui résume les résultats de trois de ces expériences, montre que le nombre total de colonies qui se développent sur les différents milieux est sensiblement constant. Le pourcentage de petites colonies sur les milieux contenant de 1 p. 1.000.000 à 1 p. 500.000, reste du même ordre de grandeur que celui du témoin, puis, à partir d'une concentration d'acriflavine de 1 p. 300.000, passe brusquement à 100 p. 100 : *la mutation s'est donc produite ici dans chacun des groupes cellulaires qui constituent une colonie isolée*. Il est parfaitement évident que l'expérience ne vérifie pas l'hypothèse de sélection de mutants préexistants.

Nous ne ferons que signaler en passant un fait sur lequel nous reviendrons longuement ailleurs : dans les concentrations d'acriflavine comprises entre 1 p. 1.000.000 et 1 p. 300.000, la majeure partie des colonies présentent un aspect très particulier : leur

TABLEAU I. — Action de l'acriflavine en milieu gélosé.

CONCENTRATION de l'acriflavine (milligrammes par litre)	59 R						BOULANGERIE-II			
	Exp. XIV		Exp. XIII		Exp. XV		Exp. XIII		Exp. XV	
	N	p. 100	N	p. 100	N	p. 100	N	p. 100	N	p. 100
0	269	3,3	223	5,8	79	3,0	176	1,1	60	0
1,0	268	3,2	187	2,7	72	8,3	123	0	63	3,1
1,11					85	3,6			68	0
1,25					110	4,7			62	1,6
1,43					87	5,7			63	0
1,66					89	1,1			69	0
2,0			222	4,0	106	2,9	180	0	53	0
3,33	246	100	241	100	105	100	187	100	62	100
5,0					78	100			56	100
10,0	238	100	176	100			192	100		
100,0	228	100	218	100			235	100		

N, nombre de colonies dans les boîtes Petri; p. 100, pourcentage de petites colonies. Le nombre de boîtes de Petri, pour chaque concentration d'acriflavine, est de 4 dans l'expérience XIV, de 5 dans l'expérience XIII et de 2 dans l'expérience XV.

surface est irrégulière et leur contour dentelé. Nous les appellerons « colonies festonnées ». La dissociation de ces colonies, suivie du réétalement de la suspension sur milieu gélosé normal, fournit un mélange de grandes et de petites colonies : elles sont donc composées d'un mélange de deux types cellulaires.

RELATION ENTRE LA MUTATION ET LE PROCESSUS DE BOURGEONNEMENT.

Dans les expériences décrites jusqu'ici, les levures étaient soumises à l'action de l'acriflavine dans des milieux nutritifs, c'est-à-dire dans des conditions favorables à leur prolifération. La multiplication cellulaire est-elle une condition nécessaire de la transformation ? Plusieurs expériences destinées à répondre à cette question ont été réalisées et ont donné des résultats concordants. Les résultats de l'une de ces expériences seront présentés en détail.

Les cellules d'une culture de la souche 59 R âgée de trois jours, culture dans laquelle la multiplication cellulaire est arrêtée, sont réparties par fractions égales respectivement dans les quatre milieux suivants :

1° Ringer.

2° Ringer acriflaviné à 1 p. 100.000.

3° Milieu à l'eau de touraillons.

4° Même milieu, acriflaviné à 1 p. 100.000.

Les tubes sont portés à l'étuve à 28°. Des numérations à l'héma-

timètre sont faites au départ, puis, six et vingt-trois heures plus tard, sur des échantillons pris dans chacun des tubes. Elles sont suivies d'étalements en boîtes de Petri qui permettent de déterminer la proportion de « grandes » et de « petites ». Chaque étalement est fait sur 10 boîtes de Petri avec 0,1 cm³ de suspension par boîte. Les numérations à l'hématimètre sont destinées à établir : 1° le nombre de *groupes* cellulaires, dont on déduit la dilution à faire pour les étalements ; 2° le nombre de *cellules* qui permettra de juger de la multiplication des levures.

Le tableau II donne les résultats de cette expérience. Il montre

TABLEAU II. — Action de l'acriflavine en milieu nutritif et non-nutritif.

	MILIEU NON-NUTRITIF								MILIEU NUTRITIF							
	Témoin				Acriflaviné				Témoin				Acriflaviné			
	N	n	p. 100	C	N	n	p. 100	C	N	n	p. 100	C	N	n	p. 100	C
Au départ (1).	1.859	7	0,4	972												
6 h. à 28° . .	481	5	1,0	1.017	478	2	0,4	1.036	436	3	0,7	3.188	456	24	4,9	2.610
23 h. à 28° . .	530	3	0,6	1.019	438	4	0,9	1.200	383	3	0,8	8.650	449	120	44,6	8.410

(1) Les valeurs données sur cette ligne sont les mêmes pour les quatre tubes.

N, nombre total de grandes colonies dans les boîtes Petri ; n, nombre de petites ; p. 100, pourcentage petites colonies ; C, nombre de cellules, en milliers par 0,1 cm³, d'après les numérations à l'hématimètre.

clairement que, dans un milieu qui permet la prolifération des levures, l'action de l'acriflavine est perceptible (4,9 p. 100 de « petites », au lieu de 0,5-1,0 p. 100 du témoin) dès que les cellules ont accompli une à deux « divisions », et est manifeste (44,6 p. 100 de « petites ») au bout de trois générations cellulaires (4). Au contraire, même un séjour prolongé des levures dans un milieu acriflaviné dépourvu des éléments nécessaires à leur multiplication, ne conduit pas à l'augmentation du pourcentage des colonies mutantes.

ACTION DE L'ACRIFLAVINE SUR LES LEVURES DIPLOÏDES.

Le choix de levures haploïdes pour les expériences décrites ci-dessus a été dicté par la facilité de détection de mutations géniques, plus grandes chez les haploïdes que chez les diploïdes.

(4) La précocité de l'arrêt de multiplication est due ici à l'importance de l'inoculum.

Cependant, la transformation que nous avons observée sous l'action de l'acriflavine présente un certain nombre de traits si étrangers aux mutations géniques connues qu'il nous a paru intéressant de reproduire un certain nombre d'expériences avec des souches diploïdes. Sans entrer dans les détails de ces expériences, nous en donnerons brièvement les résultats.

1° L'étalement de la souche diploïde *Boulangerie II* sur agar acriflaviné conduit à la formation de petites colonies dans les mêmes conditions que pour la souche 59 R (qui, en s'en souvient, a été isolée d'un asque de *Boulangerie II*). Deux expériences ont

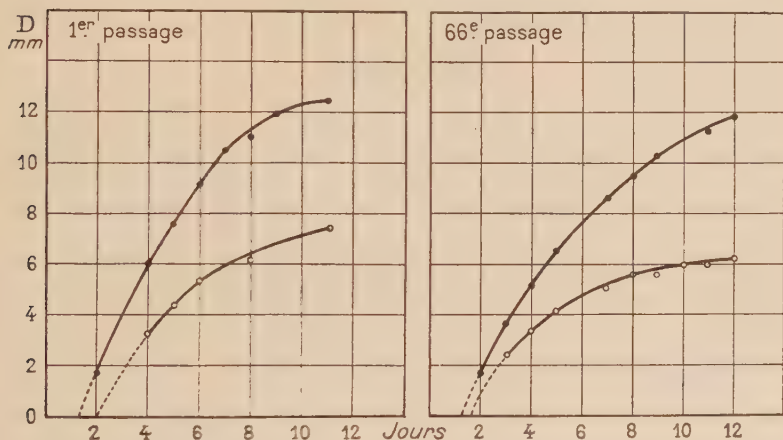


FIG 4. — Courbes de croissance des colonies des souches normale (points) et acriflavinée (cercle) de *Saccharomyces ellipsoideus* « Pouilly II » après 1 et 66 passages en milieu liquide normal, ordonnée, diamètre moyen des colonies en millimètres; abscisse, temps.

été réalisées simultanément sur les deux souches, et la comparaison des colonnes 2 et 4 (Expérience XIII) et 2 et 5 (Expérience XV) du tableau I montre que la transformation se produit sensiblement à la même concentration pour les deux souches (5). On notera par ailleurs la présence dans les cultures diploïdes témoins de « petites spontanées ». La proportion de celles-ci est, semble-t-il, un peu inférieure à celle observée dans les cultures haploïdes.

2° Un traitement par l'acriflavine en milieu liquide de *S. ellipsoideus* « Pouilly II » a été suivi d'isolement d'une petite colonie.

(5) Seule la zone des concentrations où se forment les colonies festonnées est plus étroite pour les levures diploïdes, ce qui semble indiquer une résistance légèrement plus grande à l'acriflavine.

Celle-ci est à l'origine d'une souche qui a subi de nombreux passages en milieu liquide normal avec, de temps en temps, étalement en boîtes de Petri et mesure de la croissance des colonies. Les résultats des mesures effectuées aux premier et soixante-sixième passage (fig. 4) montrent indubitablement le maintien du caractère mutant.

3° En outre, la même transformation, sous l'action de l'acriflavine, a été obtenue dans les cultures diploïdes de *S. cerevisiæ*, souche « Yeast Foam », de *S. carlsbergensis*, *S. mandshuricus*, *S. italicus* et *S. validus*. Dans toutes ces espèces, on observe, du reste, la présence de mutants spontanés du même type que ceux qui prédominent dans les cultures acriflavinées.

DISCUSSION.

Comme il a été indiqué dans l'introduction, nous différencierons au mémoire VI la discussion générale des deux principaux problèmes posés par les observations précédentes, à savoir du problème du mécanisme de la transformation des populations de levure sous l'action de l'acriflavine et de celui de la nature génétique des mutants. Dans ce qui suit, nous nous limiterons simplement à relever les quelques éléments relatifs à ces problèmes qui se dégagent dès maintenant et qui devront ultérieurement contribuer à cette discussion.

1° On a vu que la mutation « petite colonie » peut être obtenue aussi bien chez les levures haploïdes que chez les levures diploïdes de plusieurs espèces. Le phénomène de transformation, que nous avons décrit, présente donc une très grande généralité.

Dans toutes les espèces citées nous avons observé la présence de mutants spontanés du type qui nous intéresse ici. Dans les populations en équilibre, leur proportion est de l'ordre de 1 p. 100 et il est quelque peu étonnant de constater que leur présence universelle dans les populations de levures n'ait jamais été décrite. Nous attribuons ce fait à l'usage, encore très répandu dans les études sur les levures, de « colonies géantes », c'est-à-dire de colonies qui ont pour point de départ de grands nombres de cellules.

2° Un premier trait saillant de la transformation subie par les levures sous l'action de l'acriflavine est sa *spécificité*. Ce sont, en effet, toujours *les mêmes mutants* qui prédominent dans les cultures acriflavinées, ce qui est attesté, comme il sera démontré plus tard, non seulement par ces grossières caractéristiques des populations que sont le taux de croissance et la taille limite des colonies, mais également par les détails de leur constitution biochimique (voir mémoires IV et V). Si l'expérience doit conduire à la conclusion que la transformation des populations de levure

en présence d'acriflavine repose sur une véritable action mutagène de cette substance, on se trouvera en présence d'une spécificité d'action qui n'a d'égale que celle des « principes transformants » extraits des pneumocoques.

3° La seule expérience, décrite dans ce mémoire, relative au dilemme : *sélection ou induction de mutations*? a fourni une réponse négative claire concernant la forme la plus simple de l'hypothèse de sélection : celle de sélection de mutants préexistant dans la population inoculée. Mais elle n'exclut pas des modalités plus complexes de sélection. Il reste entièrement possible que, dans les expériences avec l'agar acriflaviné, chacun des groupes cellulaires inoculés, quoique constitué par des cellules normales et sensibles à l'action toxique de l'acriflavine, se multiplie cependant suffisamment en présence de cette substance pour donner naissance à une cellule mutante, plus résistante à l'action de l'acriflavine, qui serait le point de départ de la petite colonie mutante que l'on observera en fin d'expérience. Cette nouvelle hypothèse cadrerait évidemment avec des nombreux cas décrits dans la littérature microbiologique récente. Elle fournirait une explication simple de la spécificité de la transformation sur laquelle nous venons d'insister, et du fait que cette dernière soit si strictement liée à la multiplication cellulaire. Enfin, elle rendrait compte d'un second trait remarquable de la transformation : son *caractère massif*, qui ressort particulièrement des expériences sur agar acriflaviné où la *même* mutation apparaît dans *chacun* des groupes cellulaires qui forment le point de départ des colonies individuelles.

En revanche, l'hypothèse de sélection exige un taux de mutations spontanées très considérable et peu commun aux mutations géniques. Sa vérification requiert une étude quantitative détaillée des phénomènes décrits ci-dessus. Cette étude fera l'objet du VI^e mémoire.

4° Une dernière question doit être posée ici. La mutation étudiée est-elle irréversible? A première vue, les expériences décrites p. 357 et 359 (repiquages en série des mutants), indiquent qu'il en est indubitablement ainsi. Nous savons, en effet, aujourd'hui que les cellules normales ont un avantage sélectif sur les mutants (Cf. mémoire VI) et il paraît certain que, si des mutations réverses s'étaient produites au cours des passages effectués, les cellules normales seraient rapidement devenues prédominantes dans nos cultures. Cette conclusion apparaît cependant moins évidente lorsqu'on se rend compte qu'à chaque repiquage un échantillon relativement restreint de la population est transféré dans le nouveau milieu et qu'il suffit que la mutation réverse soit très rare pour qu'elle ait des chances considérables d'échapper à la détection dans des expériences du type décrit. A vrai dire, nous

ne pensons pas que cela ait été le cas dans nos expériences : le nombre de passages que nous avons effectués constitue, nous semble-t-il, une garantie suffisante pour que même une réversion rare ait été décelée. Il nous paraît vraisemblable que les mutants, que nous avons ainsi examinés, représentent un état parfaitement stable, état qui, dans notre esprit, est le terme final et irréversible d'une transformation qui comporte des états intermédiaires réversibles. Comme il a été dit p. 359, nous avons, en effet, observé que le réétalement de petites colonies de formation récente conduit quelquefois au développement d'un mélange de petites et de grandes colonies. Dans de tels clones des « réversions » au type normal s'étaient donc produites. Mais l'estimation précise de la proportion de lignées mutantes, qui redonnent des « grandes » dans leur descendance végétative, est compliquée par les erreurs d'échantillonnage que nous avons signalées plus haut. Tout ce que l'on peut dire, c'est que ces « réversions » semblent être beaucoup plus fréquentes dans les lignées de « petites » qui résultent d'une transformation récente : sinon on ne comprendrait pas que la même technique de repiquage n'ait jamais révélé de « réversions » au cours des centaines de passages que nous avons fait subir à certaines lignées.

Nous croyons donc qu'à côté des « petites » stables, il existe des « petites réversibles », mais nous devons reconnaître que le fait, que les colonies sont formées à partir de « paquets » de cellules plutôt qu'à partir de cellules individuelles, s'oppose à l'affirmation qu'il s'agit d'une réversibilité vraie et non du retour à la prolifération active de cellules normales (« grandes ») provisoirement inhibées par l'acriflavine.

RÉSUMÉ.

1° Le traitement par l'acriflavine d'une population de cellules de levure conduit rapidement à une transformation de celles-ci. Si la concentration d'acriflavine est suffisamment élevée, la transformation porte sur la population entière qui est alors composée uniquement de cellules plus petites, qui prolifèrent plus lentement et forment des colonies de taille finale réduite.

2° Cette transformation est stable. Son maintien a été observé dans une lignée au cours de 266 repiquages, c'est-à-dire pendant plus de 1.600 générations cellulaires.

3° La transformation ne se produit qu'à l'occasion du bourgeonnement.

4° Elle peut être obtenue aussi bien dans les lignées haploïdes que diploïdes.

5° Des formes présentant des caractéristiques semblables à celles des levures acriflavinées, se rencontrent avec une fréquence

de l'ordre de 1 p. 100 dans des cultures normales de plusieurs espèces de levures.

6° La transformation de la levure, observée en présence d'acri-flavine, peut être due, soit à l'induction de mutation par cette substance, soit à la sélection de mutants spontanés. Des expériences, effectuées avec des milieux acriflavinés gélosés, indiquent qu'il ne s'agit pas de sélection de mutants préexistant dans l'inoculum. Mais l'intervention de formes plus complexes de sélection reste possible.

BIBLIOGRAPHIE

- EPHRUSSI (Boris). In « *Unités biologiques douées de continuité génétique* ». C. N. R. S., Paris, 1949.
- LEDERBERG (Joshua). *Heredity*, 1948, **2**, 145.
- LURIA (S. E.). *Bact. Rev.*, 1947, **11**, 1.
- McILWAIN (H.). *Biochem. J.*, 1942, **35**², 1311.
- WINGE (O.). *C. R. Labor. Carlsberg*, 1935, **21**, 77.
- WINGE (O.) et LAUSTSEN (O.). *C. R. Labor. Carlsberg*, 1937, **22**, 99.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

Séance du 3 février 1949.

Présidence de M. MAGROU.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter les « *Elementi di Microbiologia Pedologica* », L. Macri, éditeur, Florence, 1948, par le professeur Onorato Verona, membre de notre Société.

Dans ce livre, en langue italienne, d'une agréable présentation, notre collègue a réuni une masse de notions se rapportant au sol et à sa microbiologie.

L'ouvrage se compose de trois parties. Dans la première sont traitées les considérations générales sur la formation et la constitution des sols, la microbiologie du sol, de l'air et des eaux, ainsi que les notions touchant au traitement et à la destinée des eaux usées ainsi qu'à leur épuration.

La deuxième partie traite de la formation de l'humus et de la minéralisation des substances organiques, du cycle biologique de l'azote, des associations symbiotiques des légumineuses, des processus de nitrification et de dénitrification ainsi que des types fermentaires aérobies et anaérobies qui par l'intermédiaire des microbes du sol jouent un rôle dans la formation du CO_2 , dans le métabolisme des glucides, de la cellulose et des différents éléments chimiques entrant dans la composition des plantes.

La dernière partie traite plus particulièrement de la microbiologie des plantes, des maladies de ces dernières ainsi que des maladies du sol, des causes pouvant entraver, favoriser ou améliorer le rendement des différents sols principalement par les méthodes microbiologiques ou en relation avec les actions bactériennes.

Une table analytique détaillée facilite au lecteur la recherche des points qui l'intéressent ; de nombreux schémas et photographies illustrent le texte.

Ce volume a l'avantage de réunir une grande documentation qui, pour être en général classique, n'en est pas moins habituellement dispersée en une quantité d'ouvrages. Aussi est-il appelé à rendre service aussi bien à ceux qui veulent s'initier aux questions de microbiologie pédologique qu'aux spécialistes qui y trouveront nombre de données numériques et de renseignements précieux.

COMMUNICATIONS

**TRANSMISSION DIRECTE DE L'HOMME A LA SOURIS
D'UNE SOUCHE DE VIRUS DE LA MALADIE
DE NICOLAS ET FAVRE (*LYMPHOGRANULOMA VENEREUM*)**

par J.-C. LEVADITI, P. LÉPINE, P. VINZENT et L. REINIÉ.

Il est classique en Europe de considérer que la maladie de Nicolas et Favre ganglionnaire humaine ne peut être qu'exceptionnellement transmise directement de l'homme à la souris.

Depuis 1932, de tels passages directs furent essayés en vain (1). Les seules réussites qui furent signalées sont celles de Wassen (2) et de Findlay (3), ce dernier, prélevant du pus ou des ganglions inguinaux de malades contaminés en dehors de l'Europe, a réalisé, à neuf reprises, la transmission directe de l'homme à la souris. Une autre tentative plus récente est celle de Bocage, Lépine et Chev   (4) qui ont provoqué directement chez la souris une méningo-encéphalite caractéristique, transmissible au singe, à partir d'une folliculite suppurée du prépuce.

En Amérique, au contraire, le passage direct de l'homme à la souris est de réalisation courante et c'est cette technique que conseille Rake (5) comme étant la meilleure pour isoler les souches de provenance humaine.

Le fait que la maladie de Nicolas et Favre est actuellement en voie d'extinction en Europe, tandis que sa fréquence reste élevée ailleurs, permet de croire à une plus grande virulence des souches extra-européennes. Le cas suivant vient renforcer la probabilité de cette hypothèse.

En octobre 1948, un Sénégalais, originaire de Dakar, qui navigue sur bateau américain, vient consulter, au Havre, pour une adénopathie inguinale récente, caractéristique de la maladie de Nicolas et Favre, et dont la contamination a eu lieu en dehors de l'Europe.

On prélève à la seringue un demi centimètre cube de pus inguinal qui, placé en ampoule scellée, est adressé à l'Institut Pasteur.

Ce pus est dilué dans dix fois son volume d'eau physiologique puis inoculé par voie intracérébrale    3 souris de race dite « suisse » provenant d'un élevage français. Le sixième jour après l'inoculation, ces animaux sont malades, dos courbé, poils hérissés, crises convulsives,

(1) C. LEVADITI, P. RAVAUT, P. LÉPINE et M  lle R. SCHOEN, *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 285.

(2) E. WASSEN, *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **414**, 493.

(3) G. M. FINDLAY, *Trans. Roy. Soc. trop. Med.*, 1933, **27**, 35.

(4) A. BOCAGE, P. LÉPINE et J. CHEV  , *Bull. Soc. Fr. Derm. Syph.*, novembre 1936, 1660.

(5) G. W. RAKE, in *Viral and Rickettsial Infections of Man*, de T. RIVERS, J. B. Lippincot Company,   diteur, Philadelphie, 1948.

paralysies. Deux meurent le septième jour au cours d'une crise convulsive ; le même jour, la troisième souris est sacrifiée agonisante. Après vérification de leur stérilité, les cerveaux des souris sont broyés, mis en suspension en eau physiologique et inoculés par voie intracérébrale à deux lots de 9 souris, l'un est constitué par des souris dites « suisses » de la même lignée que celles du premier passage, l'autre par des souris non sélectionnées. Toutes les souris « suisses » meurent le cinquième ou le sixième jour. La maladie des souris du second lot est moins aiguë : 7 d'entre elles meurent entre le sixième et le dix-septième jour. Les deux dernières survivent encore.

Les altérations histologiques observées dans le névraxe de toutes ces souris sont caractéristiques de la lymphogranulomatose vénérienne : méningo-encéphalite histiocytaire diffuse, non suppurative, présence de nombreux kystes contenant des granulo-corpuscules de Miyagawa.

Par la suite, des passages réguliers de souris à souris ont été réalisés par voie intracérébrale, le septième passage a été fait en janvier 1949 et le délai de l'incubation-maladie se prolonge progressivement puisqu'à ce passage, 5 des souris inoculées sont mortes du cinquième au vingt-troisième jour et 7 survivent encore.

La souche ainsi isolée est bien une souche de virus de la maladie de Nicolas et Favre :

1° Cette souche inoculée par voie intracérébrale à un *Cynocephalus babuin* provoque une méningo-encéphalite lymphogranulomateuse extrêmement intense transmissible à la souris. A partir du cerveau de ce singe, il est possible de préparer un antigène de Frei spécifique.

2° Cette souche est également pathogène pour un singe de même espèce par inoculation intraganglionnaire. La tuméfaction ganglionnaire locale, la virulence des ganglions excisés le septième jour et les altérations histologiques sont caractéristiques. Enfin le sérum prélevé le vingt-troisième jour a permis de réaliser la déviation du complément vis-à-vis d'un antigène lymphogranulomateux suivant la technique de Mac Kee, Rake et Shaffer (6).

3° Avec la suspension virulente utilisée pour inoculer le premier *Cynocephalus babuin*, 2 lapins sont inoculés par voie intracérébrale. Tous deux restent en apparence bien portants. Le premier est sacrifié le neuvième jour et on constate dans son névraxe des lésions de méningo-encéphalite ainsi qu'une inflammation des plexus choroïdes manifestement en rapport avec le virus de la maladie de Nicolas et Favre. Le cerveau du second lapin, sacrifié le vingt-sixième jour, était également le siège de lésions caractéristiques, mais dans les deux cas tous les passages essayés sur la souris furent négatifs.

Conclusions : Il résulte de ces constatations qu'il a été possible, à partir du pus d'un bubon inguinal humain de transmettre le virus de la maladie de Nicolas et Favre directement de l'homme à la souris. Ce résultat inhabituel en Europe a été obtenu dans des conditions particulières. L'origine du prélèvement : marin de race noire contaminé en dehors de l'Europe ; l'espèce des souris réceptives ; la haute virulence du

(6) C. M. MAC KEE, G. RAKE et M. F. SHAFFER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1942, 49, 132 et G. W. RAKE, in *Diagnostic procedures for Virus and Rickettsial Diseases*, American Public Health Association, éditeur, New-York, 1948.

produit à l'origine qui s'est atténuée progressivement lors des passages de souris à souris et qui est confirmée par une certaine sensibilité de l'organisme du lapin, espèce animale réputée non réceptive à la maladie, en sont les caractéristiques principales.

Sachant la grande diffusion de la lymphogranulomatose vénérienne dans le Nouveau Monde et sa faible diffusibilité actuelle en Europe, c'est bien à la haute virulence de cette souche de provenance extra-européenne que paraît devoir être attribuée cette transmissibilité directe de l'homme à la souris.

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

CULTURE EN PROFONDEUR DU BACILLE TUBERCULEUX EN MILIEU DE SAUTON ADDITIONNÉ DE SÉRUM DE CHEVAL ET TITRAGE DE CERTAINS ANTIBIOTIQUES

par J. SOLOMIDÈS.

Les travaux de Drea (1), puis ceux de Youmans (2) ont montré que les bacilles tuberculeux en suspension fine et homogène étaient capables de se développer en profondeur dans certains milieux de culture synthétiques se rapprochant plus ou moins du milieu de Sauton. Nous avons donc repris ces expériences en employant comme milieu de culture le milieu de Sauton ordinaire.

Nous nous sommes vite aperçu que dans ce milieu de culture le bacille tuberculeux ne se développait en profondeur que difficilement et irrégulièrement, bien que lesensemencements aient été faits avec des doses considérables de bacille tuberculeux : 1 ou 2 mg. de bacilles mis en suspension dans l'eau par la méthode classique des ballons à billes de verre. Par contre, en introduisant 1/30 de sérum de cheval dans ce même milieu, nous sommes parvenu à obtenir un milieu de culture dans lequel le bacille tuberculeux se développe en profondeur avec une extrême facilité. En effet, ce milieu ensemencé avec des quantités de bacilles au moins 100 fois plus faibles que dans les expériences précédentes (0,01 mg.) présente un début de développement sous forme d'un faible dépôt dès le sixième ou septième jour. La culture est extrêmement abondante vers le dixième ou douzième jour. Des ensemencements faits avec des doses plus élevées, 1 mg. ou 0,1 mg., donnent lieu à une culture beaucoup plus rapide, alors que des ensemencements beaucoup plus faibles de l'ordre de 0,001 mg. ou même de 0,0001 mg. ne donnent naissance à un développement appréciable que vers le quinzième ou vingtième jour.

La culture bacillaire ainsi obtenue est, dans tous les cas, grossière-

(1) DREA, *J. Bact.*, 1940, **39**, 197 et 1942, **44**, 149.

(2) YOUMANS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1944, **57**, 122 ; *J. Bact.*, 1946, **51**, 703.

ment granulaire ; rassemblée au fond des tubes, elle ne présente aucune tendance à se développer en surface, même après des séjours prolongés à l'étuve ; repiquée sur milieu de Löwenstein, elle donne naissance à des colonies bacillaires typiques.

La suppression de la glycérine dans ce milieu de culture ne semble pas entraver le développement du bacille qui y pousse dans les mêmes délais et aussi abondamment que dans le même milieu contenant de la glycérine.

De même, la substitution au sérum de cheval de la fraction V des protéines bovines entrant dans le milieu de Dubos, au taux de 1/150, n'empêche pas le bacille tuberculeux de se développer abondamment dans les mêmes délais que dans le milieu de Sauton additionné de sérum.

Les suspensions bacillaires qui nous ont servi à ensemercer nos milieux de culture ont été obtenues (dans des ballons à billes de verre) à partir de cultures sur pommes de terre, âgées de moins d'un mois. On prépare une première suspension contenant 1 mg. de bacilles par centimètre cube, qu'on dilue par la suite dans l'eau distillée à 1/10. 0,1 cm³ de cette suspension (0,01 mg. de poids humide de bacilles) sert à ensemercer un tube à essai contenant 10 cm³ environ de milieu de culture. C'est là la quantité de bacilles que nous avons systématiquement employée et que nous considérons comme optimum pour le titrage des antibiotiques dans ce milieu de culture, titrage dont nous allons maintenant parler.

Pour chaque substance titrée, nous disposons d'une série de tubes à essai (de 17 mm.) contenant environ 9 cm³ de milieu de culture (de Sauton) additionné de 0,3 cm³ de sérum de cheval conservé au frigidaire et de quantités décroissantes d'antibiotique ainsi que d'au moins un tube témoin ne contenant pas d'antibiotique. Tous les tubes sont ensemençés avec la même quantité de suspension bacillaire (0,1 cm³ contenant 0,01 mg. de bacilles), bouchés au coton et laissés inclinés sur des plateaux à l'étuve pendant douze à quatorze jours. Les résultats sont enregistrés après agitation des tubes à essai de façon à obtenir une suspension grossière dans les tubes où la concentration de l'antibiotique était assez faible pour permettre un développement bacillaire. Les tubes aux concentrations plus fortes restent parfaitement clairs.

En opérant ainsi nous avons titré un certain nombre d'antibiotiques, dont voici les taux tuberculostatiques :

TAUX TUBERCULOSTATIQUE

Paraaminosalicylate de sodium	1/5 à 1/10.000.000
Salicylate de sodium	1/20.000
Distillat d'huile de ricin :	
a) Solutions alcooliques	1/100.000
b) Solutions aqueuses	1/400.000
Distillat d'huile de foie de morue : solutions	
alcooliques ou aqueuses	1/30.000 à 1/50.000
Fractions du distillat d'huile de foie de morue	
en solution alcoolique :	
a) Insaponifiable	1/30.000
b) Acides gras	1/10.000

Comme on le voit, l'activité antituberculeuse du paraaminosalicylate titrée par ce procédé est à peu près identique à celle trouvée par d'autres procédés (3). Notons aussi que le distillat d'huile de ricin solubilisé dans l'eau par une méthode analogue à celle que nous avons employée pour solubiliser les huiles dans l'eau (4), se trouve considérablement potentialisé et que cette potentialisation semble de même nature que celle subie par les esters éthyliques des acides gras de l'huile de foie de morue (morrhuate d'éthyle) solubilisés dans l'eau par le même procédé et le même solvant [émulsoy 0] (5).

Quant au distillat d'huile de foie de morue, huile douée d'activité thérapeutique remarquable dans l'eczéma, les brûlures et beaucoup de maladies cutanées (6), constatons que son activité antituberculeuse se trouve concentrée dans sa fraction insaponifiable, fraction dont l'activité ne semble pas influencée par la présence de sérum à la manière de sa fraction acide dont l'activité en ce milieu au sérum est relativement faible. Enfin, il est à noter qu'en ce qui concerne le distillat d'huile de foie de morue, nous avons obtenu des résultats analogues en opérant en milieu de Dubos.

DISCUSSION. — L'introduction de quantités relativement faibles de sérum dans le milieu de Sauton modifie considérablement le comportement et très vraisemblablement le métabolisme du bacille tuberculeux. Quand on ensemence le milieu de Sauton normal avec de grandes quantités de bacilles en suspension dans l'eau, ces germes se développent très mal en profondeur et ont tendance à remonter à la surface et à se développer en voile. Par contre, sous l'influence du sérum, le bacille de Koch pousse en profondeur et ne présente plus aucune tendance à remonter à la surface. On peut donc conclure que sous l'influence du sérum le bacille devient moins aérobic, moins avide d'oxygène.

D'autre part, d'après Dubos et Davis (7), la glycérine a une action nuisible sur le développement du bacille de Koch en profondeur, alors que d'après Youmans (8) cette substance a une action stimulante. Or il ressort de nos expériences qu'en présence de sérum le bacille tuberculeux pousse aussi bien en présence qu'en l'absence de glycérine. Il n'a plus besoin de cette substance comme il n'a plus besoin de beaucoup d'oxygène. Ses besoins énergétiques ou respiratoires se trouvent satisfaits autrement et l'action du sérum sur le développement du bacille tuberculeux ne paraît pas pouvoir se résumer uniquement en une simple action de neutralisation de substances nocives contenues dans le milieu de culture ainsi que l'admettent, depuis Dubos, les auteurs anglo-saxons.

Au point de vue de l'utilisation pratique du milieu de Sauton additionné de sérum aux titrages des antibiotiques antituberculeux, notons

(3) YOUMANS et coll., *J. Bact.*, 1947, **54**, 409.

(4) J. SOLOMIDÈS, *Ces Annales*, 1948, **74**, 331.

(5) J. SOLOMIDÈS, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 769.

(6) J. SOLOMIDÈS, *Ces Annales*, 1948, **75**, 392 et *La France Méd.*, 1948, II, n° 7, 6. — J. CABIBEL, *Soc. de Médecine de Paris*, séance du 22 janvier 1949.

(7) DUBOS et DAVIS, *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 409.

(8) YOUMANS, *J. Bact.*, 1948, **56**, 235.

que ce milieu est beaucoup plus simple et d'un prix de revient beaucoup moins élevé que celui de Dubos. En effet, il n'entre dans sa constitution ni la fraction V des protéines bovines, ni le Tween 80, dont de récents travaux ont montré qu'il n'est pas sans action sur les divers antibiotiques titrés en milieu de Dubos (9). Enfin, il n'est pas nécessaire de faire des suspensions bacillaires très fines pour obtenir un développement bacillaire, comme dans le procédé de Youmans (2). La finesse de la suspension bacillaire ne semble influencer que très peu sur le développement du bacille tuberculeux en milieu de Sauton additionné de sérum.

Conclusions : Sous l'influence de concentrations relativement faibles de sérum (1/30), le bacille tuberculeux se développe en culture submergée dans le milieu de Sauton, dans des délais raisonnablement courts (à partir du sixième jour quand on ensemence avec 0,01 mg. de bacilles). Ce développement peut se faire en présence ou en l'absence de glycérine.

Le milieu de Sauton additionné de 1/150 de la fraction V des protéines bovines de Dubos reste toujours un très bon milieu de culture en profondeur pour le bacille tuberculeux.

Le milieu de Sauton additionné de 1/30 de sérum de cheval a servi au titrage de certains antibiotiques antituberculeux, tels que le paraminosalicylate de sodium, le salicylate de sodium, le distillat d'huile de ricin, le distillat d'huile de foie de morue et ses fractions acide et insaponifiable. On obtient ainsi des résultats constants et superposables à ceux qu'on obtient en milieu de Dubos ou de Youmans.

(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

MICROMANIPULATION EN FLUORESCENCE APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA VARIATION DE LA FLUORESCENCE AVEC L'ÂGE DES BACTÉRIES

par Y. T. TCHAN et J. AUGIER.

Une suspension de micro-organismes dans un milieu liquide quelconque additionné d'une quantité adéquate de fluorochrome, absorbe ce colorant avec une intensité qui varie d'un individu à l'autre pour un même champ microscopique. Ce fait a déjà été décrit par S. Strugger et P. Hilbrich (1) et J.-C. Levaditi et J. Augier (2).

Il est évidemment très intéressant de pouvoir isoler au micromanipulateur les micro-organismes suivant leur comportement en présence

(9) A. YOUMANS et G. YOUMANS, *J. Bact.*, 1948, **56**, 245.

(1) S. STRUGGER et P. HILBRICH, *Deutsch. tierärztl. Wochenschr.*, 14 mars 1942, 121.

(2) J.-C. LEVADITI, P. LÉPINE et J. AUGIER, *Ces Annales*, 1949, **76**, 194.

du fluorochrome. Cette différence est en liaison avec son état physico-chimique. Elle est donc à même de renseigner sur son état physiologique de même que sur son organisation cytologique.

Pour réaliser cette étude, il faut d'abord mettre au point une technique de micromanipulation en fluorescence. Cette idée a déjà été suggérée par Strugger (3) qui n'a donné aucun détail technique.

En effet, pour obtenir le maximum de fluorescence, il faut que le foyer du condenseur se trouve juste sur la préparation. Cela revient à dire qu'on ne dispose que de 1,5 mm. à 2 mm. d'espace libre entre la platine et la lamelle où se trouve la suspension de micro-organismes. Cet espace quoique très faible permet tout de même d'opérer si l'on prend certaines précautions.

Une deuxième difficulté est constituée par la non-fluorescence des micro-instruments et l'insuffisance de luminosité du milieu de culture malgré la présence du fluorochrome ajouté pour colorer les germes.

Voici les détails que nous avons adoptés après plusieurs essais.

1° *Fabrication d'une chambre à huile spéciale.* — Tailler une lame mince de mica blanc de 5 cm. sur 3,5 cm. Coller sur l'une des faces deux lames de verre de 2,5 cm. sur 0,5 cm., épaisses de 2 mm., distantes l'une de l'autre de 2 cm.

2° *Préparation du milieu.* — Ajouter 0,1 cm³ d'orangé d'acridine à 2 p. 1.000 et 0,1 cm³ de fluorescéine à 0,5 p. 1.000, à 10 cm³ de la culture étudiée. Ce milieu est assez fluorescent pour permettre de distinguer les bords des gouttelettes et il n'est pas trop lumineux pour masquer la fluorescence secondaire des germes.

3° *Mise en place de la préparation et réglage de l'éclairage.* — Mettre une goutte du milieu ci-dessus sur une lamelle. Renverser cette lamelle sur la chambre à huile conformément à la technique classique de Comandon et de Fonbrune (4). Il est indispensable de mettre une goutte d'huile de vaseline entre le condensateur et la chambre pour assurer une bonne continuité optique. Il ne faut pas employer l'huile de cèdre qui est fluorescente.

Mettre au point en lumière blanche pour ne pas risquer de briser la chambre à huile.

Passer en fluorescence en utilisant les écrans décrits par l'un de nous (5). Régler le faisceau de façon à obtenir le maximum de fluorescence. Il doit être légèrement convergent. Rappelons qu'il faut se servir d'un condenseur à grande ouverture et d'une lampe 6 V. à 5 V. à filament boudiné (type Nacet).

Pour rendre fluorescent les micro-instruments, il faut les tremper dans une solution de fluorescéine de même concentration que le milieu indiqué ci-dessus.

Avec ces quelques précautions, on peut manipuler comme de coutume.

Application. — Nous avons appliqué cette technique pour contrôler l'interprétation que Strugger et Hilbrich (1) ont donné pour expliquer le fait que dans une culture, certaines bactéries sont colorées en vert et d'autres en orange par l'orangé d'acridine. Ces auteurs pensent que

(3) S. STRUGGER, *Canada J. Res.*, 1948, **26**, 188.

(4) P. DE FONBRUNE, *Micromanipulateur pneumatique et microforge*, 1937, éditeur : Société industrielle d'imprimerie, Levallois-Perret.

(5) J. AUGIER et R.-O. PRUDHOMME, *Ces Annales*, 1948, **75**, 223.

les bactéries vertes sont vivantes tandis que les bactéries oranges sont mortes. La différence de teinte est due à une différence d'absorption du fluorochrome, les bactéries oranges étant celles qui en absorbent le plus.

Si cette affirmation est exacte, les bactéries vertes doivent pouvoir se multiplier, tandis que les bactéries oranges doivent se montrer stériles.

Nous sommes partis d'une culture de colibacilles âgée de quinze heures. Il n'y a pas de germes oranges. Nous avons choisi ce germe parce que sa culture à partir d'une seule cellule est certaine. Nous avons fait une vingtaine de cultures monocellulaires. Toutes ont été positives.

Si l'on part d'une culture de trois jours, on constate qu'il y a trois sortes de germes : les uns vert brillant, les autres orangés, et des formes intermédiaires que nous considérons comme jaunes.

Sur 25 cultures monocellulaires de germes verts il y a 2 échecs.

Sur 25 cultures monocellulaires de germes jaunes il y a 8 échecs.

Sur 25 cultures monocellulaires de germes oranges il y a 22 échecs.

La difficulté d'appréciation des couleurs peut conduire l'expérimentateur à classer les formes « jaunes » dans les formes dites « vertes » ou dans les formes dites « oranges », ce qui ne manquerait pas de modifier les résultats ci-dessus.

CONCLUSION. — De toute façon, d'un point de vue statistique, il est certain qu'on peut admettre que les bactéries franchement vertes sont vivantes et les bactéries franchement oranges sont mortes si l'on ne considère que leur pouvoir de multiplication. La question reste ouverte pour les formes intermédiaires au sujet desquelles il serait imprudent de conclure.

La couleur de fluorescence ne donne donc qu'une indication approchée mais cependant valable sur le plan statistique.

LA CULTURE DES LÉGUMINEUSES ET LA FORMATION DE NITRATES DANS LE SOL

par O. VERONA.

Des recherches anciennes ont montré une formation de nitrates plus intense dans le sol cultivé avec des Légumineuses qu'avec d'autres plantes (1), d'où l'action favorable de celles-ci sur les Graminées. Cependant des résultats discordants (2) nous ont incité à reprendre ce problème.

(1) TACKE, *Zentralbl. Bakt.* H, 1910, **26**. — LIPMAN, *J. Agr. Sci.*, 1910, **3** ; *Agr. exp. Sta. Bul.*, 1912, **253**. — LYON et BIZZEL, *Agr. exp. Sta. Bul.*, 1911, **294**. — PILZ, *Zentralbl. Bakt.* H, 1913, **37**. — EWANS, *J. Am. Soc. Agr.*, 1916, — WAKSMANN, *Soil Sci.*, 1916.
— WAKSMANN, *Soil Sci.*, 1916.

(2) WESTGATE et OAKLEY, *J. Am. Soc. Agr.*, 1914. — WRIGHT, *J. Am. Soc. Agr.*, 1919.

Un terrain (sol de constitution moyenne, non acide, assez pauvre en carbonate et en matières organiques) a été cultivé, partie en fèves, partie en blé. Nous y avons dosé à intervalles réguliers les nitrates et avons recherché les germes nitrifiants dans la rhizosphère des plantes. (Dosage des nitrates par la méthode de Spurway (3) ; recherche des ferments nitreux et nitriques par la méthode de Winogradsky.)

Pour le premier stade de développement des plantes nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences sensibles entre le lot à fèves et le lot à blé. Mais par la suite les nitrates et ferments nitrifiants furent trouvés plus abondants dans le lot à fèves.

L'action favorable de la culture des Légumineuses sur la formation des nitrates est donc confirmée. Elle est en rapport avec la prolifération des ferments nitrifiants dans la rhizosphère de ces plantes. Cette prolifération est elle-même corrélative du dégagement d'ammoniaque par *Bact. radicola* (*Rhizobium leguminosarum*). Le dégagement d'ammoniaque est donc le phénomène initial et déterminant. Mais la dispersion physique de l'ammoniaque dans le sol et sa réutilisation, en particulier par les oligonitrophiles (4), peuvent interférer avec son oxydation nitrique et rendre ainsi irréguliers les phénomènes que nous avons observés, ce qui explique les résultats négatifs de certains auteurs.

(Institut de Microbiologie Agricole de l'Université de Florence, Italie.)

SURVIE DES BACILLES DE KOCH APRÈS ACTION DE STREPTOMYCINE A FORTE CONCENTRATION *IN VITRO*

par F. TISON.

L. Sula (1) a montré que les colonies de bacilles tuberculeux *vivants* avaient la propriété de noircir en quelques heures au contact d'une solution de tellurite de potassium à 1/1.000.

Les bacilles tués par les acides phénoliques (2), par le vieillissement (1), par le formol ou par le chauffage modéré, ne présentent plus cette propriété.

Nous avons cru pouvoir utiliser ce phénomène pour étudier rapidement la streptomycine-résistance. Nous pensions en effet que les colonies de bacilles mis en contact avec des doses actives de l'antibiotique perdraient la propriété de noircir au contact du tellurite.

En fait l'expérience montre que même un contact prolongé avec une solution de streptomycine à 1.000 γ par centimètre cube, s'il inhibe complètement la culture du *Mycobacterium*, n'empêche en rien le phénomène vital du noircissement du tellurite.

(3) SPURWAY, *Agr. exp. Sta. Bul.*, 1938, 132.

(4) KAUFMANN, POCHON et TCHAN, *Ces Annales*, 1948, 75, 83.

(1) L. SULA, *Am. Rev. Tub.*, 1947, 56, 241.

(2) KURT, *Ces Annales*, 1948, 75, 272.

Cela vient confirmer les intéressantes constatations de Courmont, Gardère, et Denies (3) qui ont observé que les cultures peuvent se développer après un arrêt de trente ou cinquante jours dans les tubes ayant reçu de la streptomycine.

Les procédés courants de mesure de streptomycinosensibilité indiquent la dose *bactériostatique in vitro*, et non la dose bactéricide.

(Centre Sanatorial de Passy.)

UNE GÉLOSE EXTRAITE D'ALGUES MARINES ESPAGNOLES

par FRANCISCO CABRERO-GOMEZ.

Depuis l'époque où Koch fit connaître la gélose et l'introduisit dans la technique bactériologique courante, ce produit n'a cessé de recevoir des applications constantes et de plus en plus larges. La gélose, employée en Europe, était à peu près exclusivement importée du Japon. Pendant la guerre de 1914-1918, un certain nombre de pays cherchèrent sur la côte des algues productrices d'agar-agar, et en particulier les Etats-Unis mirent sur pied une industrie de la gélose sur le littoral californien. Le rendement de cette industrie était malheureusement insuffisant et couvrait à peine les besoins des laboratoires américains.

Pendant la dernière guerre mondiale, on tenta de trouver en Europe des substances de remplacement de la gélose : alcools polyviniques (Schutz), acide silicique (Winogradsky, Hetcher, Monch, Holborn, etc.), pectines de sources diverses (Mehlitz, Wohlfell, Funck, Schbeider, etc., Duseau, Galloway, Robler), cellulose, papier cellophane ou hydrate de cellulose, tourbe, gomme adraganthe, mucilages de mauvisque, lichen d'Islande, amidon de maïs et de pomme de terre (Zimmermann). D'autres auteurs ont fait des efforts pour obtenir des extraits d'algues (fucus et laminaires).

En Italie, Pesenti extrait d'une algue une substance semblable à l'agar-agar japonais, mais le rendement est si faible qu'on ne peut l'industrialiser.

Walker et Day, Orr et Marshall utilisent une variété d'algues rouges (genre *Condrus*) et trouvent une substance qui donne des gelées lorsqu'on y ajoute des sels divers.

Depuis l'année 1940, nous avons étudié la flore marine du littoral espagnol en cherchant des algues du genre *Gellidium* dans les endroits où le climat et les conditions océanographiques étaient semblables à ceux du Japon. Sur les côtes occidentales d'Espagne, baignées par un courant tiède, on trouve des algues en quantités suffisantes pour une exploitation industrielle sans qu'on ait besoin de les cultiver artificiellement.

(3) P. COURMONT, GARDERE et DENIES, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1414.

L'algue que nous avons choisie a été classée comme *Gellidium corneum* Lamour, et peut donner jusqu'à 40 p. 100 d'agar. Pour extraire l'agar de ces algues, nous les faisons bouillir après avoir essayé l'action de la vapeur sous pression, d'effet plus rapide mais donnant un agar de qualité inférieure, qui provoque une hydrolyse des groupes « galactose ». L'extraction sans pression, même si elle se prolonge, donne un agar de la meilleure qualité. Par filtration, on obtient un liquide épais qui, en refroidissant dans les moules, forme une gelée très dure que l'on purifie par congélation à 10° C. L'action du froid aide à la dessiccation qui se fait au soleil pendant l'été, ou dans des chambres à air conditionné en hiver. On broie ensuite dans un moulin les lames et fibres pour obtenir une poudre qui peut être utilisée.

Voici les caractéristiques chimiques de la gélose espagnole :

Hydrates de carbone.	75	p. 100
Protéines	3	—
Cellulose	0,30	—
Gommes.	2,25	—
Eau.	9	—
Cendres.	5,50	—

Depuis l'année 1940 nous employons cette gélose en bactériologie, aussi bien dans la préparation des milieux de culture pour l'isolement des bactéries, que dans la production en masse pour la préparation des vaccins microbiens, etc. Les bactéries pigmentées, telles que pyocyanique et staphylocoque, produisent normalement leur pigment.

Les milieux préparés avec cette gélose et auxquels on incorpore des indicateurs colorés donnent des réactions normales. Dans les milieux de culture pour les champignons dont le pH est très bas, l'agar espagnol donne une bonne gelée, ne précipitant pas, ne ramollissant pas, et sa surface a la même solidité que si le milieu était neutre.

Dans le titrage des produits antibiotiques où la qualité de la gélose a tant d'importance, l'agar espagnol a donné de magnifiques résultats. Urgoiti et Urioste le considèrent comme supérieur à l'agar japonais.

Nos résultats ont été présentés à la Société Espagnole de Microbiologie, en 1948, et ils ont été l'objet de nombreuses autres publications. Beaucoup de bactériologistes espagnols emploient normalement cette gélose, dont la production industrielle est parfaitement au point.

BIBLIOGRAPHIE

- CABRERO-GOMEZ (F.). *Revista Ibys*, 1943, **1**, 41.
 CABRERO-GOMEZ (F.). *Revista de Sanidad e Higiene Publica*, 1944, **2**, 134.
 CABRERO-GOMEZ (F.). *Ion*, 1945, **53**, 105.
 CABRERO-GOMEZ (F.). *Ion*, 1946, **54** et **55**, 3 et 67.
 CABRERO-GOMEZ (F.). Communication présentée à la Société de Microbiologie, juin 1948.
 CABRERO-GOMEZ (F.). Travail présenté au concours annuel des prix du Conseil supérieur des Recherches scientifiques (1948).

(*Instituto de Biologia y Sueroterapia Ibys* [Madrid],
 Directeur Dr A. RUIZ FALCO.)

Les communications suivantes paraissent ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Technique d'identification rapide des Entérobactériacées, par F. ROLAND et M^{lle} D. BOURBON.

La phagorésistance des colonies secondaires est-elle toujours due à une mutation spontanée ? Cas du bactériophage staphylococcique Twort, par P. NICOLLE et G. CONGE.

Antibiotiques et lyse bactériophagique. I. — Protection, vis-à-vis d'un bactériophage, des colonies qui se développent à la périphérie de la zone d'action de la streptomycine (*Staphylococcus albus* Twort et *St. aureus* S3K), par E. EDLINGER.

Calculateur circulaire pour l'évaluation du nombre de jours séparant deux dates, par J.-C. LEVADITI, P. LÉPINE et L. REINIÉ.

Action de la streptomycine sur le tissu nerveux en culture, par G. BARSKI et J. MAURIN.

Recherches sur la formation d'acétoïne aux dépens de l'acide pyruvique et l'éthanal par *Bacillus subtilis*, par M. LEMOIGNE, M. HOOREMAN et M^{me} M. CROSON.

Formes hyperactives hydrolabiles du para-aminosalicylate de sodium et substances protectrices de ces formes, par J. SOLOMIDÈS et E. BOURLAND.

Le Gérant : G. MASSON.